

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

**Rekonstitution des
Lysinbiosyntheseweges
(Diaminopimelinsäureweg)
in Vitro**

von
Bernd Laber
aus Schwelm

Bochum 1987⁸



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
DER
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

REKONSTITUTION DES LYSINBIOSYNTHESEWEGES (DIAMINOPIMELINSÄUREWEG)

IN VITRO

VON
BERND LABER
AUS SCHWELM

BOCHUM 1987

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Amrhein
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	III
Enzyme	III
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	6
1. Herkunft und Anzucht von Mikroorganismen	6
2. Chemikalien	6
2.1. Feinchemikalien	6
2.2. DL-Aspartat- β -Semialdehyd	7
2.3. meso-Diaminopimelinsäure	7
2.4. DL-2,3-Dihydrodipicolinsäure	7
2.5. Pyridoxalphosphat- und NADP-Sepharose	8
3. Bestimmung antimikrobieller Aktivitäten mittels Agar- diffusionstest	8
4. Lysinproduktion durch <i>Corynebacterium glutamicum</i>	8
5. Bestimmung von Lysin	8
6. Proteinbestimmung	8
7. Gelelektrophorese	9
8. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (FPLC)	9
9. Enzymextraktionen	9
10. Enzymmessungen und Enzymanreicherungen	9
10.1. Aspartat Kinase	10
10.2. Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase	10
10.3. Dihydrodipicolinat Synthase	11
10.4. Dihydrodipicolinat Reduktase	11
10.5. meso-Diaminopimelat Dehydrogenase	12
10.6. meso-Diaminopimelat Decarboxylase	12
10.7. Homoserin Dehydrogenase	13
10.8. Saccharopin Dehydrogenase	14
11. Lysinsynthese	14

	Seite
III. Ergebnisse	15
1. Das in vivo-Testsystem	15
2. Reinigung und Charakterisierung der Enzyme des Diaminopimelinsäureweges	21
2.1. Aspartat Kinase	21
2.2. Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase	24
2.3. Dihydrodipicolinat Synthase	28
2.4. Dihydrodipicolinat Reduktase	39
2.5. meso-Diaminopimelat Dehydrogenase	41
2.6. meso-Diaminopimelat Decarboxylase	46
3. Das in vitro-Testsystem	53
3.1. Trennung von Substraten und Reaktionsprodukten	53
3.2. Enzymkonzentrationen und Kofaktoren	54
3.3. Zeitabhängigkeit der Lysinsynthese	56
3.4. pH-Optimum der Lysinsynthese	56
3.5. Authentizität des gebildeten Lysins	57
3.6. Feedback-Hemmung	60
3.7. Hemmung durch Acetylphosphinat	60
3.8. Hemmung durch CGA-Verbindungen	61
IV. Diskussion	63
1. Das in vivo-Testsystem	63
2. Untersuchungen an den Enzymen des Diaminopimelinsäureweges	67
3. Das in vitro-Testsystem	72
4. Allgemeine Überlegungen	78
V. Zusammenfassung	82
VI. Literaturverzeichnis	85

Abkürzungsverzeichnis

ASA	DL-Aspartat- β -Semialdehyd
DAP	Diaminopimelinsäure
DC	Decarboxylase
DEAE	Diethylaminoethyl
DH	Dehydrogenase
DHDPA	DL-Dihydrodipicolinsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
2-ME	2-Mercaptoethanol
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Enzyme

Aspartat Kinase	
EC 2.7.2.4	ATP: L-Aspartat-4-phosphotransferase
Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase (ASA-DH)	
EC 1.2.1.11	L-Aspartat-4-semialdehyd: NADP ⁺ Oxidoreduktase (phosphorylierend)
Dihydrodipicolinat Synthase (DHDPA-Synthase)	
EC 4.2.1.52	L-Aspartat-4-semialdehyd Hydro-lyase (Pyruvat addierend und cyclisierend)
Dihydrodipicolinat Reduktase (DHDPA-Reduktase)	
EC 1.3.1.26	2,3,4,5-Tetrahydrodipicolinat: NADP ⁺ Oxidoreduktase
meso-Diaminopimelat Dehydrogenase (DAP-DH)	
EC 1.4.1.16	meso-2,6-Diaminoheptandioat: NADP ⁺ Oxidoreduktase (deaminierend)
meso-Diaminopimelat Decarboxylase (DAP-DC)	
EC 4.1.1.20	meso-2,6-Diaminoheptandioat Carboxy-lyase
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase	
EC 1.1.1.49	D-Glucose-6-phosphat: NADP ⁺ 1-Oxidoreduktase
Homoserin Dehydrogenase	
EC 1.1.1.3	L-Homoserin: NADP ⁺ Oxidoreduktase
Saccharopin Dehydrogenase	
EC 1.5.1.7	N ^ε -(L-1,3-Dicarboxypropyl)-L-Lysin: NAD ⁺ Oxidoreduktase (L-Lysin-bildend)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Die Verwendung von Herbiziden ist eine wesentliche Praktik der modernen Landwirtschaft. In den letzten Jahren vergrößerte ein gesteigertes ökologisches Bewußtsein zunehmend den Bedarf an solchen Herbiziden, bei denen eine hohe Wirksamkeit mit einem minimalen Risiko für die menschliche Gesundheit und für die Umwelt kombiniert sind.

Besonders attraktive Angriffspunkte für Herbizide sollten daher Stoffwechselwege, die ausschließlich bei Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen, sein, weil man erwarten kann, daß Inhibitoren dieser Stoffwechselwege in ihrer Wirkung tatsächlich auf diese Organismen begrenzt sind und damit eine geringe Toxizität gegenüber Mensch und Tier aufweisen.

Neben Hemmstoffen der Photosynthese werden seit einiger Zeit in steigendem Maße Hemmstoffe der Biosynthese von essentiellen Aminosäuren¹⁾ als Herbizide eingesetzt. Beispiele für derartige Herbizide sind Glyphosat, ein Hemmstoff der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren (zusammenfassende Darstellung bei AMRHEIN, 1986) und die Gruppen der Sulfonylharnstoffe (LEVITT et al, 1981) und Imidazolinone (SHANER et al, 1984), welche die Biosynthese der Aminosäuren mit verzweigten aliphatischen Seitengruppen hemmen (zusammenfassende Darstellung bei RAY, 1986).

Der Erfolg dieser Herbizide hat die Biosynthese der aromatischen und verzweigtkettigen aliphatischen Aminosäuren zu einem neuen Forschungsschwerpunkt der Biochemie und Molekularbiologie gemacht. Keines der bisher bekannten Herbizide, deren Wirkort die Biosynthese essentieller Aminosäuren ist, hemmt jedoch die Synthese der vom Aspartat abgeleiteten essentiellen Aminosäuren Lysin, Methionin und Threonin. Daher werden in Zukunft die Reaktionsfolgen dieser Biosynthesewege steigendes Interesse als potentieller Wirkort neuer Inhibitoren finden.

Die hier vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Entwicklung eines Testsystems, das den gezielten Nachweis von Hemmstoffen der Biosynthese der Aminosäure Lysin ermöglichen soll.

Die Biosynthese von Lysin erfolgt in der Natur über zwei völlig verschiedene Biosynthesewege, die jeweils nach einer charakteristischen Zwischenstufe benannt werden.

¹⁾ Aminosäuren, die vom Menschen nicht durch Eigensynthese gebildet werden können, sondern mit der Nahrung zugeführt werden müssen.

Der α -Aminoadipinsäure-Weg dient nur bei Niederen Eukaryonten einschließlich einiger **Phycomycetes** (**Chytridiales**, **Blastocladales** und **Mucorales**), Hefen und Höheren Pilzen (**Ascomycetes** und **Basidiomycetes**) sowie bei Eugleniden der Lysinsynthese (zusammenfassende Darstellung bei BHATTACHARJEE, 1983 und 1985).

Prokaryonten, einige **Phycomycetes** (**Hypochytriales**, **Saprolegniales** und **Leptomyetales**) und Grüne Pflanzen bilden Lysin über den Diaminopimelinsäure-Weg (zusammenfassende Darstellung bei UMBARGER, 1978; HERRMANN und SOMERVILLE, 1983). Organismen in denen beide Biosynthesewege nebeneinander vorkommen, sind bisher nicht bekannt geworden.

Bei Organismen, die über den Diaminopimelinsäure-Weg verfügen, stammt ein Teil der Kohlenstoffatome sowohl von Lysin, Methionin, Threonin als auch Isoleucin aus dem Aspartat, und diese vier Aminosäuren haben die ersten beiden Biosynthese-Zwischenstufen gemeinsam. Die biochemischen Eigenschaften der Enzyme des Diaminopimelinsäure-Weges und ihre Regulationsmechanismen sind bei Mikroorganismen, und dort besonders bei **Escherichia coli**, detailliert untersucht worden. Die Reaktionsfolge beginnt mit der durch das Enzym Aspartat Kinase katalysierten Phosphorylierung von L-Aspartat zum Aspartat- β -Phosphat (Abb. 1). Im nächsten Reaktionsschritt wird Aspartat- β -Phosphat in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch die Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase zu Aspartat- β -Semialdehyd reduziert. An dieser Stelle verzweigen sich die Biosynthesewege der Aminosäuren der Aspartat-Familie. Reduktion des Aspartat- β -Semialdehyds führt zum Homoserin als Vorstufe von Methionin, Threonin und Isoleucin; Kondensation mit Pyruvat, katalysiert durch die Dihydrodipicolinat Synthase, ergibt Dihydrodipicolinsäure als Zwischenprodukt bei der Lysinsynthese. Dihydrodipicolinsäure ist bei sporenbildenden Bakterienarten außerdem Vorstufe der Dipicolinsäure, einem essentiellen Bestandteil thermoresistenter Endosporen.

Reduktion der Dihydrodipicolinsäure, katalysiert durch die Dihydrodipicolinat Reduktase, ergibt Tetrahydrodipicolinsäure. Diese Verbindung kann auf drei verschiedenen Wegen in meso-Diaminopimelinsäure umgewandelt werden.

In den ersten beiden Fällen erfordert die Synthese der meso-Diaminopimelinsäure vier enzymkatalysierte Reaktionen und beginnt mit der Acylierung der Aminogruppe der heterocyclischen Tetrahydrodipicolinsäure. Die so entstandene acyclische N-Acyl-Tetrahydrodipicolinsäure wird durch Transaminierung und Deacylierung zunächst in LL-Diaminopimelinsäure umgewandelt und diese anschließend zu meso-Diaminopimelinsäure epimerisiert.



Abb. 1: Der Diaminopimelinsäure-Weg

(1) Aspartat Kinase, (2) Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase, (3) Dihydrodipicolinat Synthase, (4) Dihydrodipicolinat Reduktase, (5) Tetrahydrodipicolinat Succinylase, (6) N-Succinyl-Diaminopimelat Aminotransferase, (7) N-Succinyl-Diaminopimelat Desuccinylase, (8) Diaminopimelat Epimerase, (9) Diaminopimelat Decarboxylase, (10) Tetrahydrodipicolinat Acetylase, (11) N-Acetyl-Diaminopimelat Aminotransferase, (12) N-Acetyl-Diaminopimelat Deacetylase, (13) Diaminopimelat Dehydrogenase
(Formeln siehe Abb. 5, 6, 8, 18, 19 und 24)

Beide Wege unterscheiden sich in der Natur der verwendeten Acylgruppe. Während für *Escherichia coli* der Gebrauch von Succinyl-CoA als Acylgruppendonor charakteristisch ist (KINDLER und GILVARG, 1960), wird bei *Bacillus megaterium* (SUNDHARADAS und GILVARG, 1967) und einigen anderen *Bacillus*-Arten Acetyl-CoA anstelle von Succinyl-CoA verwendet (WEINBERGER und GILVARG, 1970). Von den an diesen Reaktionen beteiligten Enzymen sind nur die Succinyl-CoA:Tetrahydrodipicolinat N-Succinyltransferase (SIMMS et al, 1984) und die Diaminopimelat Epimerase (WISEMAN und

NICHOLS, 1984) aus **E. coli** gereinigt und charakterisiert worden. Die Gene beider Enzyme sind kloniert (RICHAUD et al, 1984; RICHAUD et al, 1987), die Nucleotidsequenz der Succinyl-CoA: Tetrahydrodipicolinat N-Succinyltransferase ist bestimmt worden (RICHAUD et al, 1984).

Bei der dritten Variante wird Tetrahydrodipicolinsäure in einem einzigen, durch das Enzym Diaminopimelat Dehydrogenase katalysierten Reaktionsschritt direkt in meso-Diaminopimelinsäure umgewandelt.

Die Umwandlung von Tetrahydrodipicolinsäure in meso-Diaminopimelinsäure erfolgt entweder ausschließlich über acylierte Zwischenprodukte (z.B. **Escherichia coli** und **Bacillus megaterium**; MISONO et al, 1986a; CHATTERJEE und WHITE, 1982), oder ausschließlich durch reduktive Aminierung der Tetrahydrodipicolinsäure (z.B. **Bacillus sphaericus**; BARTLETT und WHITE, 1985), oder aber auch durch gleichzeitigen Gebrauch dieser beiden Möglichkeiten (z.B. **Corynebacterium glutamicum** und **Bacillus macerans**; YAMAGUCHI et al, 1986; BARTLETT und WHITE, 1985).

Im letzten Reaktionsschritt der Lysinsynthese wird meso-Diaminopimelinsäure durch das Enzym Diaminopimelat Decarboxylase zu L-Lysin decarboxyliert.

Im Gegensatz zu den für die Lysinsynthese in Mikroorganismen benötigten Enzymen sind die Enzyme des Diaminopimelinsäure-Weges bei Höheren Pflanzen nur wenig untersucht. Bis heute sind fünf der an der Lysinsynthese beteiligten Enzyme aus Pflanzenextrakten isoliert worden. Das Eingangsenzym, Aspartat Kinase (Literatur bei BRYAN, 1980), konnte ebenso in einer Reihe verschiedener Pflanzen nachgewiesen werden wie die Dihydrodipicolinat Synthase (MAZELIS et al, 1977; MATTHEWS und WIDHOLM, 1978; WALLSGROVE und MAZELIS, 1980 und 1981; NEGRUTIU et al, 1984) und die den letzten Reaktionsschritt katalysierende Diaminopimelat Decarboxylase (SHIMURA und VOGEL, 1966; VOGEL und HIRVONEN, 1971; MAZELIS und CREVELING, 1978; SODEK, 1978). Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase (SASAKA und INAGAKI, 1960) und Dihydrodipicolinat Reduktase (TYAGI et al, 1983) sind nur einmal in jeweils einer Pflanzenart nachgewiesen worden.

Unklar ist, ob in Höheren Pflanzen die Umwandlung von Tetrahydrodipicolinsäure in meso-Diaminopimelat direkt durch reduktive Aminierung erfolgt, oder über succinylierte bzw. acetylierte Zwischenstufen verläuft. An Hand der vorliegenden Publikationen über den Nachweis der Diaminopimelat Epimerase in einem Extrakt aus Maisblättern (TYAGI et al, 1982) und der Diaminopimelat Dehydrogenase in Sojabohnen und Maisendosperm (WENKO et al, 1985) kann diese Frage nicht eindeutig beantwortet werden.

Wahrscheinlich sind alle Enzyme des Diaminopimelinsäure-Weges innerhalb der pflanzlichen Zelle im Chloroplasten kompartimentiert. Für diese Annahme spricht sowohl die Lokalisierung der Enzyme Aspartat Kinase (WALLSGROVE et al, 1983), Dihydrodipicolinat Synthase (WALLSGROVE und MAZELIS, 1980) und Diaminopimelat Decarboxylase (MAZELIS et al, 1976) im Chloroplasten als auch der Nachweis, daß isolierte intakte Chloroplasten Lysin im Licht aus exogen angebotenem Aspartat synthetisieren können (MILLS et al, 1980).

Nicht nur auf dem Gebiet der Lysinbiosynthese, sondern auch auf fast allen anderen Gebieten der Biochemie und Genetik übertrifft das Grundlagenwissen über Mikroorganismen das Wissen über Höhere Pflanzen bei weitem. Zusätzlich sind Mikroorganismen wegen ihres schnellen Wachstums und ihrer leichten physiologischen und genetischen Manipulierbarkeit Höheren Pflanzen bei biochemischen Untersuchungen weit überlegen. Auf Grund dieser Vorteile hat der Einsatz von Mikroorganismen in der Vergangenheit bei der Aufklärung der molekularen Wirkungsmechanismen von Hemmstoffen der Biosynthese essentieller Aminosäuren eine entscheidende Rolle gespielt. Aber auch in Zukunft -und auch in dieser Arbeit- werden Mikroorganismen bei der Suche nach neuen Herbiziden sowie bei der Aufklärung ihrer Wirkungsmechanismen bevorzugt zum Einsatz kommen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Entwicklung von Testsystemen, die bei der Suche nach neuen Herbiziden das gezielte Auffinden von Hemmstoffen der Biosynthese der Aminosäure Lysin ermöglichen sollen.

Ein hier vorgestelltes **in vivo**-Testsystem macht sich bei der Suche nach neuen Inhibitoren die Fähigkeit spezieller Bakterien zunutze, Lysin in das sie umgebende Kulturmedium ausscheiden zu können. Substanzen, die Reaktionen des Lysinbiosyntheseweges beeinflussen, reduzieren die Menge des ausgeschiedenen Lysins, was durch ein einfaches Testverfahren nachgewiesen werden kann. Zur näheren Charakterisierung der Wirkmechanismen von Substanzen, die sich im **in vivo**-Test als aktiv erwiesen haben, wird ein **in vitro**-System vorgestellt, in dem die Lysinbiosynthese mit isolierten und gereinigten Enzymen **in vitro** nachvollzogen wird. Darüber hinaus werden einige Modifikationen aufgezeigt, welche bestehende Vorschriften für die Reinigung der für das **in vitro**-System benötigten Enzyme vereinfachen, sowie verschiedene biochemische und enzymologische Eigenschaften dieser Enzyme untersucht. Außerdem wird ein schneller und empfindlicher spektrophotometrischer Test zur Messung der Diaminopimelat Decarboxylase beschrieben.

II. Material und Methoden

1. Herkunft und Anzucht von Mikroorganismen

Corynebacterium glutamicum ATCC 21488 und **Escherichia coli** ATCC 9637 stammten von der American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. **Pseudomonas fluorescens** AFT 36 wurde von Prof. U. Winkler, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität Bochum, **Saccharomyces cerevisiae** S2a von Prof. K. Esser, Lehrstuhl für Allgemeine Botanik, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Die Anzucht der Mikroorganismen erfolgte in folgenden Kulturmedien:

- E. coli**: Minimalmedium nach DAVIS und MINGIOLI (1950),
2% Glucose·H₂O
- P. fluorescens**: Minimalmedium nach VOGEL und BONNER (1956),
2% Glucose·H₂O
- S. cerevisiae**: Yeast Nitrogen Base (DIFCO Manual, 1972),
1% Glucose·H₂O
- C. glutamicum**: Vollmedium (Difco Nutrient Broth) oder Minimalmedium (Medium A). 1 l Medium A, pH 7,3, enthielt 9 g Tris, 0,54 g KH₂PO₄, 2 g NH₄Cl, 50 mg MgSO₄·7H₂O, 5 mg FeSO₄·7H₂O, 9,33 mg L-Methionin, 0,45 mg Biotin, 0,2 mg Thiamin-HCl und 10 g Glucose·H₂O.

Alle Mikroorganismen wurden bei 30°C auf einem Rundschüttler (ca. 100 Upm) gezüchtet und in der Regel durch Zentrifugation bei 10000 - 15000 g (10 Minuten) geerntet und, falls nicht sofort aufgearbeitet, bei -20°C gelagert.

20 l Bakterienkulturen von **E. coli** wurden in einem Schlaufenfermenter bei 37°C angelegt und mit einer Durchlaufzentrifuge abzentrifugiert.

2. Chemikalien

2.1. Feinchemikalien

Fein- und Biochemikalien größtmöglicher Reinheit wurden von Sigma, Serva, Boehringer, Merck, Baker oder Riedel-deHaen bezogen.

L-(U-¹⁴C)-Aspartat (8,44 GBq/mMol), (DL + meso)-2,6-Diamino-[1,7-¹⁴C]-pimelinsäure (4,37 GBq/mMol) und (1-¹⁴C)-Pyruvat

(1.11 GBq/mMol) wurden von Amersham-Buchler bezogen. Phenylsepharose CL-4B, Reactive Red 120-Agarose (Type 3000), Aminoethylsepharose 4B und DEAE-Sepharose CL-6B stammten von Sigma, Hydroxyapatit (Bio-Gel HTP) von Bio-Rad und PD-10 Säulen von Pharmacia. Saccharopin Dehydrogenase aus Bierhefe und Glucose 6-Phosphat Dehydrogenase aus *Torula*-Hefe stammten von Sigma. Alle in dieser Arbeit verwendeten Phosphon- und Phosphinsäuren und die mit "CGA" bezeichneten Verbindungen wurden freundlicherweise von der Ciba Geigy AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

2.2. DL-Aspartat- β -Semialdehyd (ASA)

Die Synthese von ASA erfolgte nach der Vorschrift von BLACK und WRIGHT (1955a) durch Ozonolyse von DL-Allylglycin (2-Amino-4-pentensäure). Nach der Ionenaustauschchromatographie wurden aminosäurehaltige Fraktionen mit Hilfe des Ninhydrintests (ROSEN, 1957) identifiziert. Der ASA-Nachweis erfolgte nach WHITE (1983) durch Bildung eines roten Kondensationsproduktes mit 2-Aminobenzaldehyd (LARSON et al, 1963). Die quantitative Bestimmung des L-Isomers von ASA erfolgte durch Umsetzung zu L-Homoserin mittels Homoserin Dehydrogenase (BLACK und WRIGHT, 1955b). Nicht umgesetztes Allylglycin wurde nach Dünnschichtchromatographie an Cellulose-Alufolien (Laufmittel Ethanol/NH₄OH 70:30) durch Detektion mit Ninhydrin (0,3% Ninhydrin in Ethanol, 2 min 120°C, grüne Flecken) identifiziert.

2.3. meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP)

meso-Diaminopimelinsäure wurde nach dem Verfahren von WADE et al (1957) aus Diaminopimelinsäure (Isomerenmischung) gewonnen. Die Reinheit der meso-DAP wurde nach der Methode von MISONO und SODA (1980a) mit 80% bestimmt.

2.4. DL-2,3-Dihydrodipicolinsäure (DHDPA)

Die Synthese von DHDPA erfolgte durch Kondensation von DL-ASA und Pyruvat (KIMURA, 1974). Zur quantitativen Bestimmung wurde das L-Isomer der DHDPA mit DHDPA-Reduktase aus *E. coli* ATCC 9637 zu L-Tetrahydrodipicolinsäure umgesetzt (KIMURA, 1974).

2.5. Pyridoxalphosphat- und NADP-Sepharose

Die Kopplung von Pyridoxalphosphat oder NADP an Aminoheptyl-Sepharose erfolgte nach den Vorschriften von CUATRECASAS (1970), HOCKING und HARRIS (1973) und IKEDA und FUKUI (1973).

3. Bestimmung antimikrobieller Aktivitäten mittels Agar-diffusionstest

Als Testorganismen dienten **E. coli** ATCC 9637 oder **S. cerevisiae** S2a. Die verwendeten Medien enthielten 2% Glucose·H₂O. Zur Durchführung der Hemmversuche wurden 3 ml des entsprechenden Minimalmediums mit 0,75% Agar bei 45°C mit 120 µl (**S. cerevisiae**) oder 40 µl (**E. coli**, angezogen in Medium mit 0,2% Glucose·H₂O) einer Übernachtskultur beimpft und in einer Petrischale über Minimalmedium mit 1,5% Agar ausplattiert. Anschließend wurde ein mit Inhibitorlösung getränktes Filterpapier (Whatman 3MM, Ø 6 mm) auf den Agar gelegt und Platten mit Bakterien ca. 16 h bei 37°C, Platten mit Hefe ca. 16 h bei 30°C bis zum Erreichen eines gleichmäßigen Bewuchses inkubiert. Als Maß für die Wachstumshemmung diente die Größe des Hemmhofes.

4. Lysinproduktion durch *Corynebacterium glutamicum*

Alle Arbeiten wurden steril ausgeführt. Bakterien einer frühstationären Kultur von **C. glutamicum** ATCC 21488 in Medium A wurden durch Zentrifugation (2500 g, 15 min) geerntet, im gleichen Volumen Medium A ohne L-Methionin resuspendiert und auf einem Rotationsschüttler inkubiert (30°C, ca. 100 Upm). Während der Inkubation wurde das Wachstum (E₆₅₀) und die Menge des ins Kulturmedium ausgeschiedenen L-Lysins gemessen.

5. Bestimmung von Lysin

L-Lysin wurde nach der Vorschrift von NAKATANI et al (1972) bestimmt.

6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Rinderserumalbumin als Standard.

7. Gelelektrophorese

SDS Polyacrylamid Gelelektrophoresen wurden in 1,5 mm dicken Flachgelen (18 x 13 cm) nach LAEMMLI (1970) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proteine wurden nach Fixierung durch Trichloroessigsäure mit Serva Blau R angefärbt. Molekulargewichts-Eichproteine stammten von Sigma.

8. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (FPLC)

Eingesetzte Säulen: MONO Q HR5/5 und SUPEROSE 12 Prep Grade HR16/50 von Pharmacia. Instrumentierung: LKB 2150 HPLC Pumpe, LKB 2152 HPLC Controller, LKB 2150 Detektor und LKB 22100 Rekorder. Die Mischung der Gradienten erfolgte niederdruckseitig. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Laufpuffer wurden zur Entgasung permanent mit Helium durchperlt. Alle Proben wurden vor Aufgabe auf die Säulen durch ein 0,22 µm Sterilfilter filtriert. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die SUPEROSE Säule mit Molekulargewichts-Markerproteinen für die Gel-filtration (Sigma) kalibriert.

9. Enzymextraktionen

Alle Arbeiten wurden bei 4°C ausgeführt. Zur Enzymextraktion wurden **E. coli** und **C. glutamicum** in Aufschlußpuffer (2 ml/g Naßgewicht) resuspendiert und im Eisbad durch Ultraschallbehandlung (7 x 1 min) aufgeschlossen. Der Enzymextrakt wurde zentrifugiert (15 min, 35000 g) und das Pellet in Aufschlußpuffer (1 ml/g Naßgewicht) resuspendiert. Nach erneuter Ultraschallbehandlung und Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt (Rohextrakt). **P. fluorescens** wurde zur Enzymextraktion in Aufschlußpuffer (1 ml/g Naßgewicht) resuspendiert, durch Ultraschallbehandlung (6 x 0,5 min) aufgeschlossen und nach Zugabe von 2 Volumina Aufschlußpuffer zentrifugiert.

10. Enzymmessungen und Enzymanreicherungen

Wenn nicht anders erwähnt, wurden bei Enzymanreicherungen alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Bei Säulenchromatographien betrug die Flußrate 1 bis 1,5 ml/min. Proteinlösungen wurden mit Hilfe von PD-10 Säulen entsalzt oder umgepuffert.

10.1. Aspartat Kinase

Die Aktivitätsbestimmung der Aspartat Kinase erfolgte bei 30°C entweder nach der Methode von STARNES et al (1972), oder durch einen optisch gekoppelten Test in Anwesenheit von Aspartat Semi-aldehyd Dehydrogenase (TRUFFA-BACHI et al, 1968).

Etwa 18 g **P. fluorescens** wurden in Puffer A (DUNGAN und DATTA, 1973a) resuspendiert und aufgeschossen. Wärmefällung, Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie an DEAE-Sepharose (Säulenabmessung: 2 x 12 cm, linearer Gradient von 0 - 0,5 M KCl, 900 ml) erfolgten nach der Vorschrift von DUNGAN und DATTA (1973a). Aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von 52,8 mg/ml Ammoniumsulfat auf eine mit 0,4 M Ammoniumsulfat in Puffer B (10 mM K-Phosphat, 1 mM L-Lysin, 1 mM L-Threonin, 10 mM 2-ME, pH 7,5) äquilibrierte Phenylsepharose Säule (2 x 6 cm) aufgetragen. Die Säule wurde nacheinander mit 0,4 M Ammoniumsulfat in Puffer B, Puffer B, 20% Ethandiol in Puffer B, und 50% Ethandiol in Puffer B (je 5 Säulenvolumina) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1% Triton X-100 in Puffer B. Aktivitätshaltige Fraktionen wurden zur Volumenreduktion auf eine mit Puffer B äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule (1,5 ml Säulenvolumen) aufgetragen und mit 1 M KCl in Puffer B eluiert.

10.2. Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase

Die Aktivität der ASA-DH wurde bei 30°C nach der Methode von HEGEMAN et al (1970) mit DL-ASA als Substrat gemessen.

20,5 g **E. coli** ATCC 9637 wurden in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM 2-ME (Puffer C) aufgeschossen. Streptomycinsulfat- und Ammoniumsulfatfällung erfolgten nach der Vorschrift von HEGEMAN et al (1970). Die entsalzte Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer C äquilibrierte DEAE-Säule (2,5 x 26,5 cm) geladen und mit einem linearen KCl-Gradienten (1000 ml; 0 - 0,5 M KCl in Puffer C) eluiert. Aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt und zur Volumenreduktion einer Ammoniumsulfatfällung (0 - 90%) unterzogen. Ausgefallenes Protein wurde in 10 mM K-Phosphatpuffer pH 8,0, 1 mM 2-ME (Puffer D) aufgenommen, entsalzt, auf eine mit Puffer D äquilibrierte NADP-Sepharose Säule (1 x 7 cm) aufgetragen und mit 1,5 M KCl in Puffer D eluiert. Nach Zugabe von 66 mg/ml Ammoniumsulfat wurde das Eluat auf eine mit 0,5 M Ammoniumsulfat in Puffer C äquilibrierte Phenylsepharose Säule (2,5 x 12 cm) gegeben, mittels eines linearen Gradienten von 0,5 - 0 M Ammoniumsulfat in

Puffer C (500 ml) eluiert, entsalzt und durch FPLC am mit Puffer C äquilibrierten Anionenaustauscher MONO Q und Elution mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,75 M KCl in Puffer C (Flußrate 0,5 ml/min) weiter gereinigt.

10.3. Dihydrodipicolinat Synthase

Die Bestimmung der Aktivität der DHDPA-Synthase erfolgte bei 37°C in Imidazolpuffer durch Messung der Extinktionszunahme bei 270 nm (YUGARI und GILVARG, 1965; 1 U = 4,95 nkat).

22 g *E. coli* ATCC 9637 wurden in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 (Puffer E) mit 10 mM Pyruvat und 100 mM KCl aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde 2 Minuten auf 70°C erhitzt, und ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 100 mM KCl in Puffer E äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule (2,5 x 26,5 cm) gegeben. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,1 - 0,4 M KCl in Puffer E (900 ml). Aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von 1/7 Volumen 3,5 M Ammoniumsulfatlösung auf eine mit 0,5 M Ammoniumsulfat in Puffer E äquilibrierte Phenylsepharose Säule (2,5 x 15 cm) gegeben. Die Säule wurde mit einem linearen Gradienten von 0,5 - 0 M Ammoniumsulfat in Puffer E (500 ml) eluiert und anschließend mit Puffer E gewaschen. Aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt, auf eine mit 10 mM K-Phosphatpuffer pH 8,0 äquilibrierte Hydroxyapatit Säule (2,5 x 16,5 cm) gegeben und mit einem linearen Gradienten von 10 - 300 mM K-Phosphatpuffer pH 8,0 (800 ml) eluiert. Die vereinigten aktivitätshaltigen Fraktionen wurden nach Zugabe von 66 mg/ml Ammoniumsulfat auf eine mit 0,5 M Ammoniumsulfat in Puffer E äquilibrierte Phenylsepharose Säule (1 x 2 cm) gegeben und mit Puffer E eluiert. Zur weiteren Reinigung durch FPLC wurde die DHDPA-Synthase auf eine mit Puffer E äquilibrierte MONO Q Säule aufgegeben und mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,5 M KCl in Puffer E eluiert (Flußrate 0,5 ml/min).

10.4. Dihydrodipicolinat Reduktase

Als Maß für die Aktivität der DHDPA-Reduktase diente die Geschwindigkeit der NADPH-Oxidation bei 37°C mit DL-DHDPA als Substrat. Der Testansatz enthielt 300 µMol Tris pH 7,4, 0,3 µMol NADPH, 0,5 µMol DHDPA und Enzym in einem Gesamtvolumen von 1 ml.

Der Rohextrakt aus 36 g *E. coli* ATCC 9637 in Puffer E wurde 3 Minuten auf 70°C erhitzt, ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ammoniumsulfatfällung (35 - 60%) unterzogen, ausgefallenes Protein abzentrifugiert, in Puffer E resuspendiert, entsalzt, auf eine mit Puffer E äquilibrierte DEAE-Sephrose Säule (2,5 x 26,5 cm) gegeben und mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,75 M KCl in Puffer E eluiert. Aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt, mit einem Volumen Puffer E verdünnt, mittels einer DEAE-Sephrose Säule (1 x 2 cm) konzentriert (TAMIR und GILVARG, 1974) und durch Gelfiltration an SUPEROSE (Laufpuffer: Puffer E, Flußrate: 0,4 ml/min) weiter angereichert. Aktivitätshaltige Fraktionen wurde vereinigt, auf eine mit Puffer E äquilibrierte MONO Q Säule aufgegeben und mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,5 M KCl in Puffer E eluiert (Flußrate 0,5 ml/min).

10.5. meso-Diaminopimelat Dehydrogenase

Die Aktivität der DAP-DH wurde bei 30°C nach der Methode von MISONO und SODA (1980b) gemessen.

Dialyse des Proteinrohextraktes von 7 g *C. glutamicum* ATCC 21488, Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie an DEAE-Sephrose und Hydroxyapatit erfolgten nach der Vorschrift von MISONO et al (1986b). Die DEAE-Säule (2 x 12 cm) wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten (500 ml; 0 - 0,5 M NaCl), die Hydroxyapatit-Säule (2,5 x 16,5 cm) mit einem linearen Phosphat-Gradienten (500 ml; 10 - 100 mM Phosphat) eluiert. Die weitere Reinigung des Enzyms erfolgte durch Chromatographie an Reactive Red 120-Agarose (WISEMAN und NICHOLS, 1984; Säulenabmessung: 1 x 7 cm, Flußrate 0,5 ml/min). Aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt, gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,4 (Puffer F) umgepuffert und einer FPLC am Anionenaustauscher MONO Q unterzogen. Die Chromatographie erfolgte mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. Gebundene Proteine wurden mit einem KCl-Gradienten (0 - 0,5 M in Puffer F) eluiert, und aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt.

10.6. meso-Diaminopimelat Decarboxylase

Die Bestimmung der Aktivität der DAP-DC erfolgte bei 37°C.

A) Nichtkontinuierlicher Test: Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 300 µl 30 µMol K-Phosphatpuffer pH 6,8, 0,3 µMol EDTA, 0,3 µMol 2,3-Dimercaptopropanol, 0,03 µMol Pyri-

doxalphosphat und 1,2 μMol meso-Diaminopimelat. Der Reaktionsstart erfolgte durch Enzymzugabe. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz 1 Minute im siedenden Wasserbad erhitzt. Zu dem auf Raumtemperatur abgekühlten Ansatz wurden 70 μMol K-Phosphatpuffer pH 6,8, 0,3 μMol NADH, 2,5 μMol α -Ketoglutarat und 0,2 U Saccharopin Dehydrogenase in einem Gesamtvolumen von 700 μl gegeben. Ausgefallenes Protein wurde wenn nötig abzentrifugiert. Nach 45 Minuten wurde die Extinktion bei 340 nm bestimmt. Der NADH-Verbrauch errechnete sich aus der Differenz je eines Ansatzes mit und ohne Diaminopimelat.

B) Kontinuierlicher Test: Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml 100 μMol K-Phosphatpuffer pH 6,8, 1 μMol EDTA, 1 μMol 2,3-Dimercaptopropanol, 0,1 μMol Pyridoxalphosphat, 0,3 μMol NADH, 4 μMol meso-Diaminopimelat, 2,5 μMol α -Ketoglutarat, 1 U Saccharopin Dehydrogenase und Enzym. Nach Starten der Reaktion durch Enzymzugabe wurde die Abnahme der Extinktion bei 340 nm kontinuierlich gegen einen Reaktionsansatz ohne Diaminopimelat verfolgt.

Die Aktivität der DAP-DC wurde außerdem nach den Methoden von SHIMURA und VOGEL (1966) und KELLAND et al (1985) bestimmt.

Alle bei der Enzymreinigung verwendeten Puffer hatten einen pH-Wert von 6,8 und enthielten 0,1 mM Pyridoxalphosphat und 0,1 mM 2,3-Dimercaptopropanol. 30 g *E. coli* wurden in 100 mM K-Phosphatpuffer, 1mM EDTA aufgeschlossen. Präzipitation der Nukleinsäuren und Ammoniumsulfatfällung (0 - 45%) erfolgten wie bei WHITE und KELLY (1965). Das Präzipitat wurde in 10 mM K-Phosphatpuffer (Puffer G) mit 0,75 M Ammoniumsulfat resuspendiert und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte Phenylsepharose Säule (2,5 x 14 cm) gegeben. Die Säule wurde mit einem konkaven Gradienten (250 ml 0,75 M Ammoniumsulfat und 600 ml 0 M Ammoniumsulfat in Puffer G) gewaschen und mit Puffer G eluiert. Aktivitätshaltige Fraktionen wurden vereinigt und auf eine mit Puffer G äquilibrierte Hydroxyapatit Säule (2,5 x 16,5 cm) gegeben. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten (600 ml) von 10 - 100 mM K-Phosphatpuffer. Die vereinigten aktivitätshaltigen Fraktionen wurden auf eine mit Puffer G äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule (2 x 12 cm) aufgegeben, die Elution der DAP-DC erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,5 M KCl (600 ml) in Puffer G.

10.7. Homoserin Dehydrogenase

Die Aktivität der Homoserin Dehydrogenase wurde bei 30°C nach der Methode von BOTHWELL und DATTA (1971) bestimmt.

10.8. Saccharopin Dehydrogenase

Die Aktivität der Saccharopin Dehydrogenase wurde bei 37°C nach der Methode von OGAWA und FUJIOKA (1978) bestimmt.

11. Lysinsynthese

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl 20 µMol HEPES pH 8,0, 10 µMol KCl, 2 µMol MgSO₄, 2 µMol NH₄Cl, 2 µMol Pyruvat, 2 µMol L-Aspartat (100 MBq), 0,01 µMol Pyridoxalphosphat, 0,1 µMol NADPH, 2 µMol ATP, 2 µMol Glucose-6-phosphat, 33 nkat Glucose-6-phosphat DH, 33 pkat Aspartat Kinase, 100 pkat ASA-DH, 13,3 mU DHDPA-Synthase, 64 pkat DHDPA-Reduktase, 140 pkat DAP-DH und 50 pkat DAP-DC. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 2 N HCl abgestoppt, der Testansatz auf eine Dowex 50 WX8 Säule (H⁺-Form, 1 ml Säulenvolumen) aufgegeben und Lysin nach der Vorschrift von NAKATANI et al (1972) eluiert. Das Eluat wurde bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 150 µl H₂O aufgenommen. Aliquots wurden im Szintillationszähler gezählt sowie nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung [Sigmacell Type 100 Cellulose auf Glas, 250 µm Schichtdicke, 20 x 20 cm, ohne Fluoreszenz-indikator, Laufmittel nach RUEPPEL et al (1977)] mit Hilfe eines Radiodünnschichtscanners ausgewertet. Die Aminosäurenanalyse und die anschließende Bestimmung der Radioaktivität in den Aminosäuren erfolgte wie bei YAGUCHI et al (1978) beschrieben.

III. Ergebnisse

1. Das in vivo-Testsystem

Bei den in der Natur weit verbreiteten coryneformen Bakterien handelt es sich um eine Gruppe meist aerob lebender, pleomorpher, nicht sporenbildender Gram-positiver Bakterien. Zu dieser Gruppe gehören einige tierpathogene Arten und Erreger verschiedenster Pflanzenkrankheiten, sowie eine große Anzahl nichtpathogener Arten. Von den nichtpathogenen coryneformen Bakterien haben besonders die Gattungen **Brevibacterium** und **Corynebacterium** als Produzenten von Aminosäuren und Nucleotiden große industrielle Bedeutung erlangt (zusammenfassende Darstellungen bei SODA et al, 1983; BLANCH et al, 1985).

Da Aminosäuren essentielle Bestandteile der Zelle sind, wird ihre Biosynthese normalerweise durch verschiedenste Kontrollmechanismen so reguliert, daß nur die für Wachstum und Entwicklung benötigten Mengen synthetisiert werden. Für die industrielle Produktion von Aminosäuren durch Fermentationsprozesse war es daher notwendig, die zellulären Mechanismen der Stoffwechselregulation durch Mutationen außer Kraft zu setzen. Dies gelang durch die Selektion auxotropher, regulatorischer oder auxotroph-regulatorischer **Corynebacterium**-Mutanten, die als Überproduzenten von Aminosäuren große wirtschaftliche Bedeutung erlangt haben. Beispiele für die Erzeugung und Selektion dieser Mutanten und für ihren Einsatz zur Produktion von Aminosäuren sind bei SODA et al (1983) beschrieben.

In dieser Arbeit wird die Fähigkeit bestimmter Stämme coryneformer Bakterien zur Überproduktion von Aminosäuren bei der Suche nach Hemmstoffen der Biosynthese von Lysin ausgenutzt. Bei dem für die weiteren Untersuchungen ausgewählten Stamm von **Corynebacterium glutamicum**, ATCC 21488, handelt es sich um eine von NAKAYAMA und KASE (1971) isolierte auxotroph-regulatorische Mutante mit der Fähigkeit zur Überproduktion der Aminosäuren L-Lysin und L-Threonin. Dieser Stamm besitzt zumindest mutativ veränderte Aspartat Kinasen und Homoserin Dehydrogenasen, die ihre Sensibilität für die negativen allosterischen Effektoren Lysin und Threonin verloren haben (ausführliche Darstellung der Regulation der Biosynthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie bei SODA et al, 1983; NAKAYAMA, 1985). Außerdem ist dieser Stamm, wie alle Aminosäure-ausscheidenden Stämme der Gattungen **Corynebacterium** und **Brevibacterium**, biotin- und thiaminbedürftig (HIROSE et al, 1985) und zusätzlich L-Methionin auxotroph.

ATCC 21488 erfüllt somit eine wichtige Voraussetzung, um bei der Suche nach neuen Inhibitoren eingesetzt werden zu können. In Form von Lysin wird eine Substanz ausgeschieden, die *de novo* synthetisiert wird und zudem das Endprodukt eines Biosyntheseweges repräsentiert, so daß die Menge des ausgeschiedenen Lysins als Maß für den Stoffdurchsatz durch den Lysinbiosyntheseweg und für die Nettosynthese von Lysin verwendet werden kann.

Es ist häufig zu beobachten, daß Antimetaboliten ihre bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkungen nur in Minimalmedien entfalten und diese Wirkungen durch in Vollmedien enthaltene niedermolekulare Verbindungen abgeschwächt oder aufgehoben werden. Um beim Einsatz von ATCC 21488 zum Screening von Hemmstoffen derartige antagonistische Wirkungen von vornherein auszuschließen, wurde ein für dieses Bakterium geeignetes Minimalmedium entwickelt, das die speziellen Nährstoffbedürfnisse dieser Art erfüllt. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in Kapitel II.1. beschrieben.

ATCC 21488 wuchs in diesem Medium (Medium A) mit einer Generationszeit von 3,75 Stunden. Die Lysinausscheidung erreichte während der logarithmischen Wachstumsphase ihren Maximalwert und die Endkonzentration an L-Lysin belief sich auf etwa 0,28 $\mu\text{Mol/ml}$ Medium (Abb. 2).

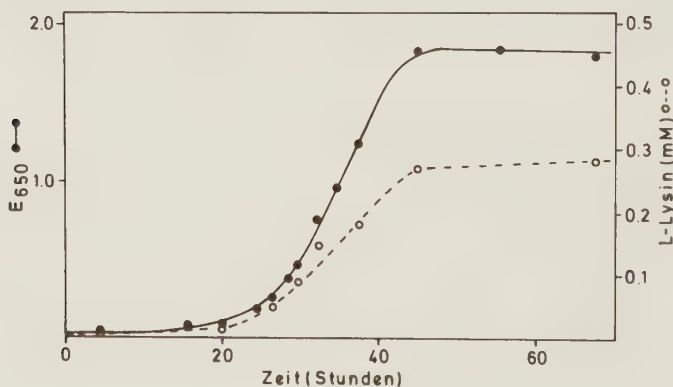


Abb. 2: Wachstum (●—●) von ATCC 21488 in Medium A und Akkumulation von L-Lysin (o---o) im Kulturmedium

Die unter diesen Kulturbedingungen ausgeschiedene Menge L-Lysin war groß genug, um nach der Abzentrifugation der Bakterien ohne vorherige Konzentrierungs- und/oder Reinigungsschritte mit einem enzymatischen Test (nach NAKATANI et al, 1972) quantifizierbar zu sein.

Die Methionin-Auxotrophie von ATCC 21488 bietet zudem die Möglichkeit, die Produktion von Lysin unabhängig vom Zellwachstum ablaufen zu lassen.

Um dies zu erreichen, wurde zunächst eine Kultur von ATCC 21488 in Medium A bis zur frühstationären Wachstumsphase herangezogen. Anschließend wurden die Bakterien steril geerntet und in Medium A ohne L-Methionin resuspendiert. In diesem Produktionsmedium wuchsen die Bakterien nicht mehr, schieden aber trotzdem Lysin aus (Abb. 3). ATCC 21488 produzierte unter den angegebenen Bedingungen etwa 9 nMol L-Lysin pro ml Medium und Stunde. Die Lysinproduktion war der Inkubationszeit direkt proportional und es unterblieben Bakterienwachstum und/oder Vermehrung.

Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Lysinausscheidung von ATCC 21488 zeigte sich, daß in Gegenwart von einigen dieser Substanzen die Menge des ausgeschiedenen Lysins im umgekehrten Verhältnis zur Hemmstoffkonzentration verringert wurde.

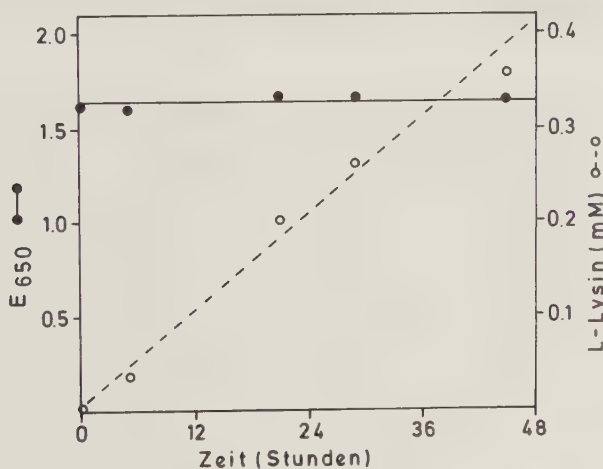


Abb. 3: Wachstum (●—●) und Lysinproduktion (o----o) von ATCC 21488 in Medium A ohne L-Methionin

Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Hemmung der Lysinproduktion durch eine dieser Substanzen, CGA 202100, als Funktion der Hemmstoffkonzentration.

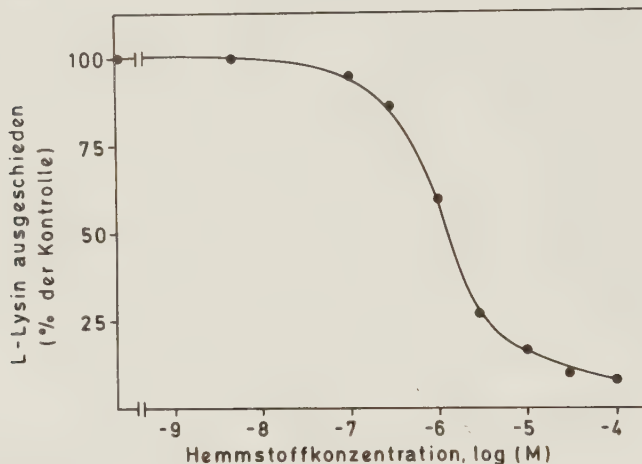


Abb. 4: Hemmung der Lysinausscheidung von ATCC 21488 als Funktion der Konzentration an CGA 202100

Die Existenz von zwei völlig unterschiedlichen Reaktionswegen für den Aufbau des Kohlenstoffgerüsts von Lysin (Diaminopimelinsäureweg und α -Aminoadipinsäureweg) kann bei der Suche nach Inhibitoren der Lysinbiosynthese ausgenutzt werden, um den oben beschriebenen *in vivo*-Test durch einen einfachen zusätzlichen Test sinnvoll zu ergänzen. Eine Substanz, die eine Reaktion des Diaminopimelinsäureweges spezifisch hemmt, sollte nämlich keine Hemmwirkung gegenüber solchen Organismen entfalten, die Lysin über den α -Aminoadipinsäureweg synthetisieren (Ausnahmen: Hemmstoffe der Aspartat Kinase und Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase). Das heißt, es sollten nur solche Verbindungen als mögliche Inhibitoren der Lysinsynthese in Betracht kommen, die ausschließlich das Wachstum des Testorganismus mit Diaminopimelatweg, oder gleichzeitig das Wachstum beider Testorganismen hemmen. Verbindungen, die ausschließlich das Wachstum des Testorganismus mit α -Aminoadipinsäureweg beeinflussen, sollten demgegenüber keine Inhibitoren von Enzymen des Diaminopimelatweges sein können.

Um diese Überlegung praktisch auszunutzen, wurden 30 verschiedenen Verbindungen, deren pI_{50} -Werte der Hemmung der Lysinexkretion in der Größenordnung von 2,46 bis 5,82 lagen, im Agardiffusionstest gegen die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, ein Organismus, der Lysin über den α -Amino adipinsäureweg bildet, und gegen das Bakterium *Escherichia coli*, das Lysin über den Diaminopimelinsäureweg synthetisiert, getestet. Bei diesen Versuchen wurden jeweils 0,5 μ Mol der zu untersuchenden Verbindung gegen die beiden Testorganismen eingesetzt.

Auf Grund ihrer wachstumshemmenden Wirkung konnten die getesteten Verbindungen in drei Gruppen eingeteilt werden, wobei die Größe der entstandenen Hemmhöfe bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. 21 der untersuchten Verbindungen hemmten nur das Wachstum der Hefe *S. cerevisiae*, 2 Verbindungen hemmten ausschließlich das Wachstum von *E. coli*, und 7 Verbindungen hemmten das Wachstum von beiden Testorganismen.

Verbindung	Hemmung der Lysinausscheidung pI_{50}	Wachstumshemmende Wirkung auf	
		<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
CGA 127990	4,80	-	+
CGA 71818	4,58	-	+
CGA 214519	3,63	+	-
CGA 47480	3,62	+	-
CGA 214858	4,07	+	+
CGA 86817	4,89	+	+

Tab. 1: Hemmung der Lysinausscheidung von ATCC 21488 (pI_{50} -Werte) durch 6 verschiedene CGA-Verbindungen und ihre wachstumshemmenden Wirkungen im Agardiffusionstest

Die pI_{50} -Werte für die Hemmung der Lysinausscheidung und die im Agardiffusionstest ermittelten wachstumshemmenden Wirkungen von jeweils zwei aus jeder Gruppe beispielhaft ausgewählten Verbindungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Frage, ob es sich bei einer der in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen tatsächlich um einen Inhibitor der Lysinbiosynthese handelt, wird erst nach der Untersuchung ihres Verhaltens in dem später noch vorzustellenden **in vitro**-Testsystem (Kapitel III.3.) beantwortet werden.

2. Reinigung und Charakterisierung der Enzyme des Diamino-pimelinsäureweges

In diesem Kapitel wird die Reinigung der für die Lysinbiosynthese benötigten Enzyme Aspartat Kinase, Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase, Dihydrodipicolinat-Synthase und -Reduktase und Diaminopimelat-Dehydrogenase und -Decarboxylase beschrieben. Außerdem werden verschiedene Eigenschaften dieser Enzyme analysiert. Zusätzlich wird zu Beginn die von dem jeweiligen Enzym katalysierte Reaktion vorgestellt und die wichtigsten seiner bisher bekannten biochemischen und enzymologischen Charakteristika kurz zusammengefaßt.

2.1. Aspartat Kinase

Der erste Reaktionsschritt in der Biosynthese von Lysin, Methionin, Threonin und Isoleucin ist die von der Aspartat Kinase katalysierte Phosphorylierung von L-Aspartat zu L-Aspartat-β-Phosphat (Abb. 5).

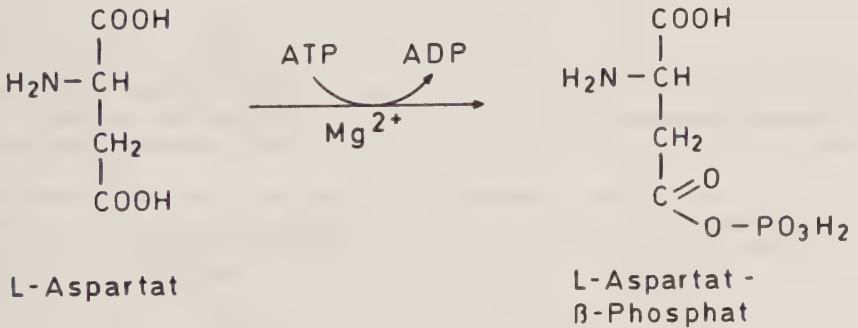


Abb. 5: Die Aspartat Kinase-Reaktion

In *Escherichia coli* wird diese Reaktion durch drei verschiedene, isofunktionelle Enzyme katalysiert, die sich in der Art und Weise unterscheiden, in der ihre Synthesen und ihre enzymatischen Aktivitäten reguliert werden. Zwei dieser Aspartat Kinasen sind zudem bifunktionelle Enzyme, die auf der gleichen Polypeptidkette zu-

sätzlich über Homoserin Dehydrogenase-Aktivität verfügen. Dies sind die Aspartat Kinase I-Homoserin Dehydrogenase I, ein tetrameres allosterisches Enzym, dessen Aktivität durch Threonin reguliert wird, und die Aspartat Kinase II-Homoserin Dehydrogenase II, deren enzymatische Aktivität durch Aminosäuren der Aspartat-Familie nicht beeinflußt wird. Die dritte Aspartat Kinase, Aspartat Kinase III, besitzt keine Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, ihre Aktivität wird aber durch Lysin reguliert. Die enzymatischen Eigenschaften aller drei Aspartat Kinasen, die Nucleotidsequenzen ihrer Strukturgene und die Regulation ihrer Synthesen und ihrer enzymatischen Aktivitäten sind detailliert untersucht worden (zusammenfassende Darstellungen bei COHEN, 1983; PATTE, 1983; ZAKIN et al, 1983; COHEN et al, 1985). Außer *E. coli* sind die Bakterien der Gattung *Bacillus* bezüglich ihrer Aspartat Kinasen gut untersucht (zusammenfassende Darstellung bei PAULUS, 1984). Im Gegensatz zu den Enterobakterien und *Bacillus*-Arten, bei denen Isoenzyme der Aspartat Kinase existieren, kommt bei Pseudomonaden nur eine einzige Aspartat Kinase vor (COHEN et al, 1969), und Aspartat Kinase und Homoserin Dehydrogenase sind zwei eigenständige Enzyme. Die Eigenschaften pflanzlicher Aspartat Kinasen sind bei BRYAN (1980) zusammengestellt.

In dieser Arbeit wurde die Aspartat Kinase aus *Pseudomonas fluorescens* gereinigt. Die enzymologischen und regulatorischen Eigenschaften dieses Enzyms wurden von DUNGAN und DATTA (1973a, 1973b) beschrieben.

Das Protokoll einer typischen Reinigung der Aspartat Kinase aus *P. fluorescens*, ausgehend von etwa 18 g Bakterien, ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Durch diese Reinigung wurde die Aspartat Kinase mit einer Ausbeute von 42% 101-fach angereichert, wobei sich die hier neu eingeführte Chromatographie an Phenylsepharose als besonders effektive Anreicherungsmethode erwies.

Im Verlauf der Reinigung konnte das Verhältnis der Aktivitäten von Aspartat Kinase zu Homoserin Dehydrogenase von 0,48 im Rohextrakt auf 0,01 in der partiell gereinigten Enzympräparation reduziert werden, d.h., die Aspartat Kinase Präparation war, bezogen auf die enzymatische Gesamtaktivität, nur zu 1% mit Homoserin Dehydrogenase verunreinigt.

Der Einfluß der Aminosäuren Lysin und Threonin auf die Aktivität der Aspartat Kinase ist in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Enzymaktivität wurde nur durch die gleichzeitige Einwirkung von Lysin

	Protein (mg)	Ges. Akt. (nkat)	Spez. Akt. (nkat/mg)	Anrei- cherung (-fach)	Aus- beute (%)
Rohextrakt	1489	343	0,23	1	100
Wärmefällung	1090	261	0,24	1	76
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	342	171	0,50	2,2	50
DEAE-Sepharose	94	157	1,67	7,3	46
Phenylsepharose/ Konzentrierung	6,1	143	23,28	101	42

Tab. 2: Reinigung der Aspartat Kinase aus *P. fluorescens*

und Threonin verringert. Beide Aminosäuren alleine hemmten die Aspartat Kinase nicht, sondern wirkten leicht aktivitätssteigernd. Dieses Ergebnis entspricht genau den von DUNGAN und DATTA (1973a) beschriebenen regulatorischen Eigenschaften der Aspartat Kinase aus *P. fluorescens*.

	Aktivität (%)
Kontrolle	100
5 mM L-Lys	128
5 mM L-Thr	127
5 mM L-Lys + 5 mM L-Thr	7

Tab. 3: Feedback-Hemmung der Aspartat Kinase-Aktivität

2.2. Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase

Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase (ASA-DH), das zweite Enzym, das die zu Lysin, Methionin, Threonin und Isoleucin führenden Biosynthesewege gemeinsam haben, katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Aspartat- β -Phosphat zu Aspartat- β -Semialdehyd (Abb. 6).

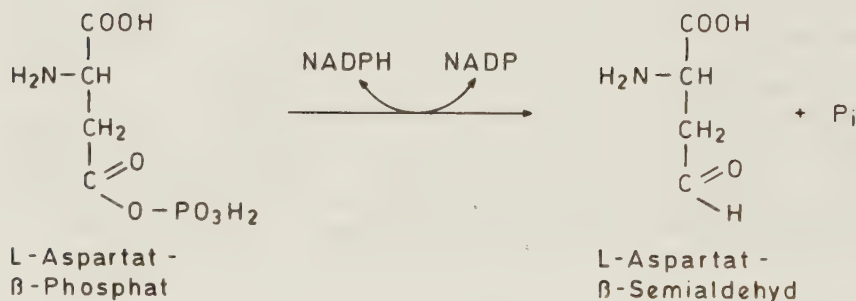


Abb. 6: Die Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase-Reaktion

Diese Reaktion ist der von der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAP-DH) katalysierten Reaktion analog, und die Reaktionsmechanismen beider Enzyme haben deswegen einige Gemeinsamkeiten. So verlaufen z.B beide Reaktionen über ein Acyl-Enzym Intermediat, und sowohl die GAP-DH als auch die ASA-DH können in der Rückreaktion anstelle von Phosphat Arsenat umsetzen.

Das Strukturgen für die ASA-DH, *asd*, kodiert in *E. coli* für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 39950 Dalton (HAZIZA et al, 1982). Das native Enzym besteht aus zwei identischen Untereinheiten (BIELLMANN et al, 1980a).

Die ASA-DH aus *E. coli* wird durch das Substratanalogon L-2-Amino-4-oxo-5-chlorpentansäure irreversibel inaktiviert. Die Inaktivierung erfolgt nur an einer von zwei Substratbindestellen der beiden Untereinheiten, aber das intakt verbleibende zweite aktive Zentrum des alkylierten Enzyms ist nicht mehr enzymatisch aktiv

(BIELLMANN et al, 1980b). L-2-Amino-4-oxo-5-chlorpentansäure reagiert mit der Seitengruppe von nur einer einzigen Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms. Diese modifizierte Aminosäure konnte als ein Cysteinrest identifiziert werden (BIELLMANN et al, 1980b; HAZIZA et al, 1982), ein Ergebnis, das gut mit dem postulierten Reaktionsmechanismus übereinstimmt. Die ASA-DH kann zudem durch ein Analogon des Coenzyms, 3-Chloracetylpyridin-ADP, irreversibel inaktiviert werden. Auch in diesem Fall ergibt sich für das inaktivierte Enzym eine Stöchiometrie von 1 Mol gebundenem Inhibitor pro Dimer (BIELLMANN et al, 1980c).

Die Primärstruktur der ASA-DH ist nicht nur von dem Enzym aus *E. coli*, sondern auch von dem Enzym aus dem Gram-positivem Bakterium *Streptococcus mutans* bestimmt worden. Die Nucleotidsequenz des *asd*-Gens von *S. mutans* codiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 38897 Dalton. Obwohl beide Proteine ein annähernd gleiches Molekulargewicht besitzen und das *S. mutans*-Gen eine Deletion des entsprechenden Gens in *E. coli* komplementieren kann, bestehen nur geringe Homologien zwischen den Aminosäuresequenzen beider Enzyme (CARDINEAU und CURTISS, 1987). In Höheren Pflanzen konnte die ASA-DH in Erbsen nachgewiesen werden (SASAKA und INAGAKI, 1960).

Die Reinigung der ASA-DH aus *E. coli* erfolgte, mit Ausnahme der Chromatographie an Phenylsepharose, im wesentlichen nach den Vorschriften von HEGEMAN et al (1970) und THIERRY et al (1980). Das typische Protokoll einer solchen Reinigung, ausgehend von etwa 20 g Bakterien, ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Bei dieser Reinigung konnten 14,5 mg ASA-DH mit einer spezifischen Aktivität von 1285 nkat/mg Protein gewonnen werden. Die Ausbeute betrug 55%. Bei der gelchromatographischen Überprüfung der Reinheit des so isolierten Proteins mittels SDS-PAGE zeigten sich nur geringe Verunreinigungen durch Fremdproteine ($\leq 10\%$). Das Molekulargewicht der ASA-DH wurde durch Gelchromatographie unter denaturierenden Bedingungen mit 41500 Dalton bestimmt. Die Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Enzyms mittels Gel-filtration an SUPEROSE ergab einen Wert von 75000 Dalton. Beide Ergebnisse stimmen gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein (BIELLMANN et al, 1980a; HAZIZA et al, 1982).

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde die Affinität der ASA-DH zu ihren Substraten durch kinetische Messungen analysiert. Wegen der Instabilität von Aspartat- β -Phosphat beschränkten sich

die Untersuchungen auf die Rückreaktion (Aspartat- β -Semialdehyd als Substrat). Es ergaben sich die folgenden apparenten K_m -Werte (Konzentrationen der nicht variierten Substrate in Klammern): DL-Aspartat- β -Semialdehyd: 1,8 mM (1 mM NADP, 40 mM P_4), NADP: 140 μ M (2 mM DL-ASA, 40 mM P_4), P_4 : 1,6 mM (2 mM DL-ASA, 1 mM NADP). Die Verwendung von Arsenat anstelle von Phosphat ergab keine signifikanten Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit und im Zeitverlauf der Reaktion.

	Protein (mg)	Ges.Akt. (μ kat)	Spez.Akt. (nkat/mg)	Anrei- cherung (-fach)	Aus- beute (%)
Rohextrakt	1418	33,6	23,7	1	100
Streptomycin- sulfat-Fällung	1006	33,4	33,2	1,4	99
(NH_4) $_2$ SO $_4$ -Fällung	495	31,7	64,0	2,7	88
DEAE-Sephарose	113	29,4	260,7	11,0	87
NADP-Sephарose	30	23,2	772,6	32,6	69
Phenylsephарose	14,5	18,6	1285,0	54,2	55

Tab. 4: Reinigung der ASA-DH aus E. coli ATCC 9637

Die Aktivität der ASA-DH wurde durch Ammoniumionen beeinflusst. So hemmte 170 mM NH_4Cl die Rückreaktion zu 50%. Für die Hinreaktion, in der Aspartat- β -Phosphat durch eine vorgeschaltete Aspartat Kinase-Reaktion gebildet wurde, ergab sich ein I_{50} -Wert von etwa 100 mM (Abb. 7).

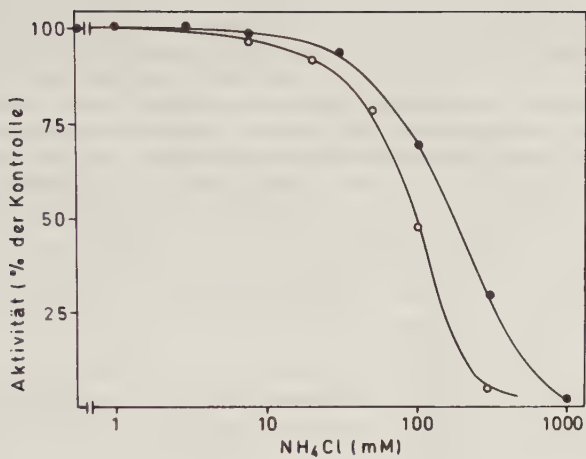


Abb. 7: Hemmung der ASA-DH durch NH_4Cl

○—○ Hinreaktion, Aspartat- β -Phosphat als Substrat,

●—● Rückreaktion, Aspartat- β -Semialdehyd als Substrat

2.3. Dihydrodipicolinat Synthase

Die Dihydrodipicolinat Synthase (DHDPa-Synthase), in *Escherichia coli* ein durch das **dap A** Gen codiertes Protein aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 31372 Dalton (SHEDLARSKI und GILVARG, 1970; RICHAUD et al, 1986), katalysiert die Kondensation von L-Aspartat- β -Semialdehyd mit Pyruvat. Das Reaktionsprodukt dieser Aldolkondensation cyclisiert anschließend unter Wasserabspaltung spontan zu 2,3-Dihydrodipicolinsäure (2,3-Dihydro-2,6-pyridindicarbonsäure, DHDPa, Abb. 8).

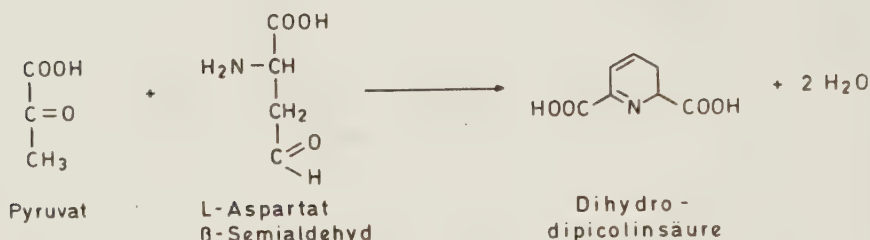


Abb. 8: Die Dihydrodipicolinat Synthase-Reaktion

Das Produkt der Reaktion, DHDPa, steht im Gleichgewicht mit 2,5-Dihydrodipicolinsäure und 4-Hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinsäure. Auf Grund der Labilität dieser heterocyclischen Moleküle konnte bisher nicht geklärt werden, welche Verbindung das eigentliche Produkt der enzymatischen Reaktion ist.

DHDPa-Synthasen sind aus *E. coli* und *Bacillus licheniformis* bis zur Homogenität gereinigt (SHEDLARSKY und GILVARG, 1970; HALLING und STAHL, 1976) und auch aus *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* und *B. cereus* isoliert worden (WEBSTER und LECHOWICH, 1970; YAMAKURA et al, 1974; HOGANSON und STAHL, 1975).

Das Enzym aus *E. coli* wird durch Lysin Feedback-gehemmt (YUGARI und GILVARG, 1962). Es ist aber fraglich, ob diese Hemmbarkeit eine physiologische Bedeutung besitzt. Mutanten mit einer desensibilisierten Aspartat Kinase III scheiden nämlich Lysin, nicht aber Threonin aus, eine unerwartete Eigenschaft von Zellen mit effizienter Regulation dieses Verzweigungspunktes (PATTE, 1983).

Die DHDPA-Synthase katalysiert wahrscheinlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Diaminopimelinsäureweg, weil eine Erhöhung der Copynumber des **dap A** Gens in einer **lys C** Mutante mit desensibilisierter Aspartat Kinase III in einem parallelen Anstieg der DHDPA-Synthase-Aktivität und der Lysinausscheidung resultiert (DAUCE et al, 1982).

DHDPA-Synthasen sind auch in Höheren Pflanzen nachgewiesen worden (Literatur bei BRYAN, 1980; WALLSGROVE und MAZELIS, 1981). Das Enzym ist im Chloroplasten lokalisiert (WALLSGROVE und MAZELIS, 1980), und die Enzymaktivität wird durch Lysin reguliert (WALLSGROVE und MAZELIS, 1981). Die Regulation des Enzyms durch Feedback-Hemmung scheint auch **in vivo** bedeutsam zu sein, weil Mutanten, die über eine Lysin-insensitive DHDPA-Synthase verfügen, Lysin überproduzieren (NEGRUTIU, 1984).

In Tabelle 5 ist das Protokoll einer Reinigung wiedergegeben, durch die die DHDPA-Synthase, ausgehend von 22 g **E. coli**, mit einer Ausbeute von etwa 39% 217-fach angereichert wurde.

	Protein (mg)	Ges.Akt. (U)	Spez.Akt. (U/mg)	Anrei- cherung (-fach)	Aus- beute (%)
Rohextrakt	1524	936	0,6	1	100
Hitzegefällung	478	705	1,5	2,4	75
DEAE-Sepharose	57,3	710	12,4	20	76
1. Phenylsepharose	16,1	577	35,8	59	62
Hydroxyapatit	7,2	527	73,2	120	56
2. Phenylsepharose	4,5	503	105,9	174	54
MONO Q	2,7	363	132,6	217	39

Tab. 5: Reinigung der DHDPA-Synthase aus **E. coli** ATCC 9637

Bei dieser Reinigung wurden 2,7 mg DHDPA-Synthase mit einer spezifischen Aktivität von 132 U/mg gewonnen. Eine gelchromatographische Überprüfung der Reinheit des isolierten Proteins mittels SDS-PAGE zeigte eine etwa 10%ige Verunreinigung der DHDPA-Synthase durch ein Fremdprotein. Etwa 90% des Proteins wanderten in einer Bande mit einem Molekulargewicht von $31,4 \pm 2,2$ kD. Das Molekulargewicht der nativen DHDPA-Synthase konnte durch Gelfiltration an SUPEROSE zu etwa 112 kD bestimmt werden. Der isoelektrische Punkt der DHDPA-Synthase wurde durch Chromatofokussierung an Polybuffer Exchanger PBE 94 zu $pI = 4,5$ ermittelt.

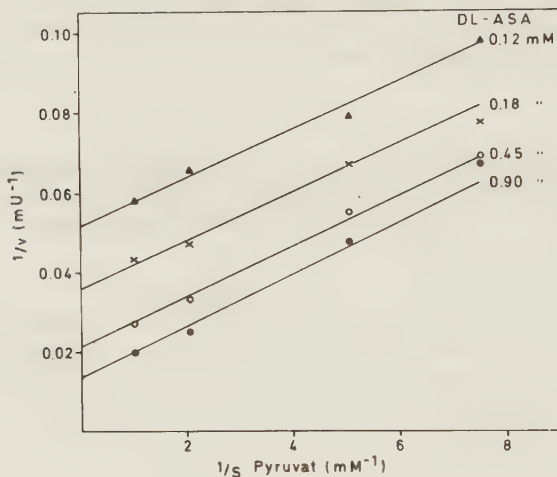


Abb. 9: Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der DHDPA-Synthase-Reaktion von der Pyruvat-Konzentration

Zur Bestimmung der K_m -Werte von Pyruvat und Aspartat- β -Semialdehyd (ASA) und zur kinetischen Charakterisierung des Reaktionsmechanismus der DHDPA-Synthase wurde eine Serie enzymkinetischer Messungen durchgeführt, bei denen die Anfangsgeschwindigkeit der DHDPA-Bildung in Abhängigkeit der beiden Substrate Pyruvat und ASA bestimmt wurde (Abb. 9, Abb. 10).

Aus den Sekundärdiagrammen zu den Abbildungen 9 und 10 (Abb. 11, Abb. 12) konnte der K_m -Wert für Pyruvat zu $K_m = 0,57 \text{ mM}$, der K_m -Wert für DL-ASA zu $K_m = 0,55 \text{ mM}$ bestimmt werden.

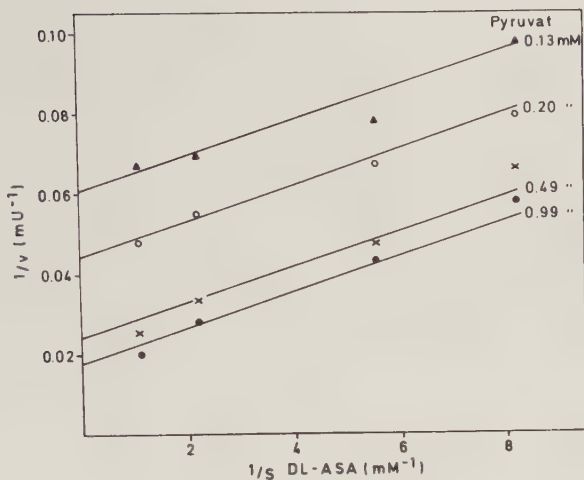


Abb. 10: Doppelt reziproke Darstellung der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der DHDPA-Synthase-Reaktion von der ASA-Konzentration

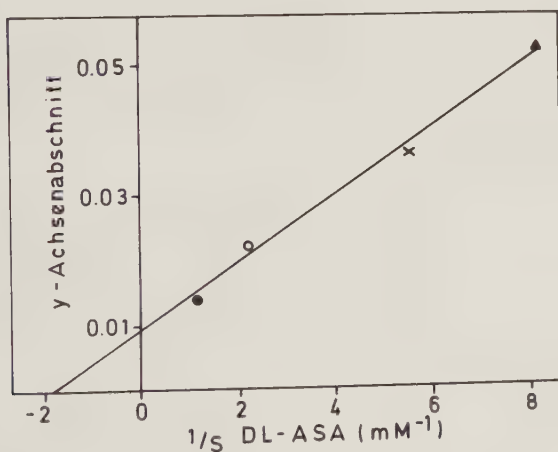


Abb. 11: Sekundärdiagramm zu Abb. 9. Abhängigkeit des y -Achsenabschnittes der in Abb. 9 erhaltenen Geraden vom Kehrwert der ASA-Konzentration

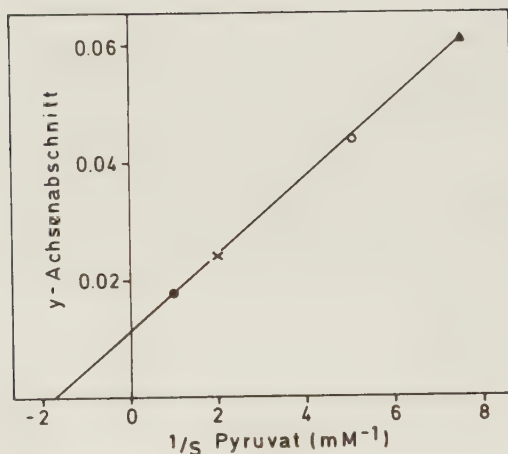


Abb. 12: Sekundärdiagramm zu Abb. 10. Abhängigkeit des y-Achsenabschnittes der in Abb. 10 erhaltenen Geraden vom Kehrwert der Pyruvat-Konzentration

Da die aus den doppelt reziproken Auftragungen der Meßwerte nach Lineweaver-Burk resultierenden Geraden (Abb. 9, Abb. 10) keine gemeinsamen Schnittpunkte besitzen und die Schnittpunkte der Geraden bei der Auftragung der Meßwerte nach Hanes (keine Abbildungen) auf der Ordinate liegen, handelt es sich beim Reaktionsmechanismus der DHDPA-Synthase um einen Ping-Pong Mechanismus (BISSWANGER, 1979).

Charakteristisch für den Ping-Pong Mechanismus ist, daß bereits nach Bindung des ersten Substratmoleküls ein Reaktionsprodukt freigesetzt wird. Gleichzeitig entsteht eine veränderte Enzymform, mit der das zweite Substrat unter Bildung des zweiten Produktes reagiert. Unter der Voraussetzung, daß Pyruvat als erstes Substrat an die DHDPA-Synthase bindet, ergibt sich der in Abbildung 13 dargestellte Reaktionsmechanismus.

Pyruvat reagiert dabei zuerst mit einer Aminogruppe im aktiven Zentrum des Enzyms (SHEDLARSKI und GILVARG, 1970), und durch Abspaltung von Wasser bildet sich eine Schiff'sche Base. Anschließend reagiert das C-4 Atom des Aspartat Semialdehyds in einer Aldolkondensation mit der Methylgruppe des Pyruvats. Aus dem freigesetzten Kondensationsprodukt entsteht durch nichtenzymatische Abspaltung eines weiteren Wassermoleküls die heterocyclische Dihydrodipicolinsäure.

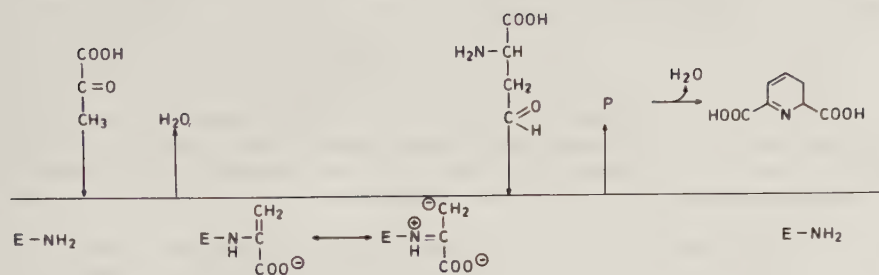


Abb. 13: Reaktionsmechanismus der DHDPA-Synthese

Die gereinigte DHDPA-Synthase wurde durch L-Lysin ($I_{50} = 1 \text{ mM}$) und S-2-Aminoethyl-L-cystein ($I_{50} = 4,6 \text{ mM}$) gehemmt (Abb. 14). 10 mM meso-Diaminopimelat hatten keinen Einfluß auf die Enzymaktivität (101% Aktivität im Vergleich zur Kontrolle).

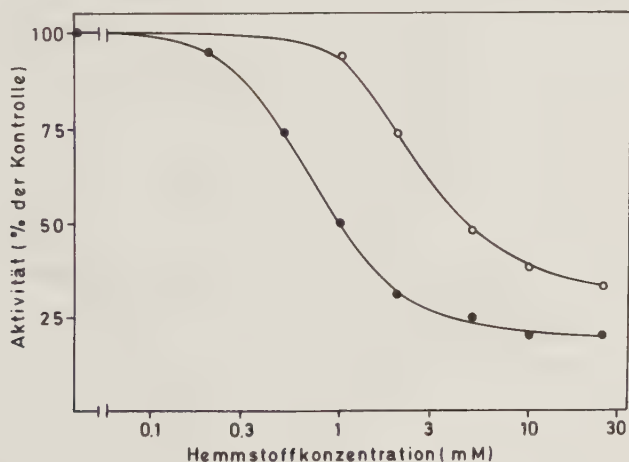


Abb. 14: Hemmung der DHDPA-Synthase durch L-Lysin (●—●) und S-2-Aminoethyl-L-cystein (○—○)

Um eine Aussage über die Substratspezifität der DHDPA-Synthase machen zu können, wurde eine detaillierte Untersuchung des Einflusses verschiedener Pyruvatanaloga auf die Aktivität des Enzyms durchgeführt.

Die 11 hier untersuchten Verbindungen lassen sich in zwei Klassen einteilen. Bei 6 Verbindungen ist ein H-Atom der Methylgruppe des Pyruvats substituiert. Bei den anderen 5 Verbindungen ist die Carboxylgruppe des Pyruvats durch einen phosphorhaltigen Substituenten ersetzt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Von den Pyruvatanaloga mit unveränderter Carboxylgruppe hatte nur Brompyruvat einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität der DHDPA-Synthase. Die doppelt reziproke Auftragung der in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration gemessenen Initialgeschwindigkeit der Kondensationsreaktion zeigte, daß Brompyruvat die DHDPA-Synthase kompetitiv in Bezug auf Pyruvat hemmt. Eine Auftragung der Meßwerte nach Dixon (Abb. 15) ergab für die Hemmkonstante einen Wert von $K_i = 1,6 \text{ mM}$.

Zusätzlich zur reversiblen Hemmung der Enzymaktivität führte eine Vorinkubation der DHDPA-Synthase mit hohen Brompyruvat-Konzentra-

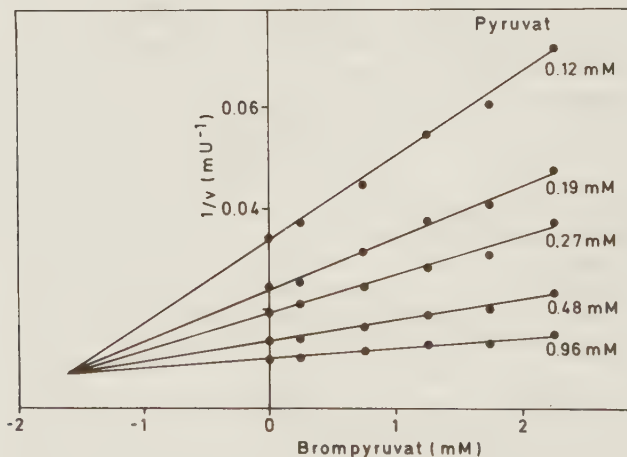


Abb. 15: Dixon-Diagramm der Hemmung der DHDPA-Synthase durch Brompyruvat

$R_2-CH_2-C(O)-R_1$		Inhibitor- konzentration (mM)	Aktivität (%)	K_4 (mM)
R_1	R_2			
COOH	H	-	100	
COOH	F	5	99	
COOH	Br	5	63	1,6
COOH	CH ₃	0,5	99	
COOH	COOH	0,5	103	
COOH	CH ₂ -COOH	5	98	
COOH	C ₆ H ₅	0,5	102	
P(O)H OH	H	5	9	0,034
P(O)(OH) ₂	H	5	111	
P(O)OH OCH ₃	H	5	83	1,8
P(O)OH OC ₂ H ₅	H	5	98	
P(O)(OCH ₃) ₂	H	5	99	

Tab. 6: Hemmung der DHDPA-Synthase durch Pyruvat-Analoga

tionen (30 mM) zu einem irreversibelen Verlust der Enzymaktivität. Diese Inaktivierung erfolgte aber weder nach einem Zeitgesetz erster Ordnung, noch war die Inaktivierung vollständig, sondern erreichte bei einem Aktivitätsverlust von 50 - 60% ihren Maximalwert. Die Ursache für dieses Verhalten wurde nicht näher analysiert.

Trotz der im Vergleich mit Brompyruvat eher noch größeren strukturellen Analogie zum Substrat der DHDPA-Synthase hatte Fluorpyruvat, auch nach längerer Vorinkubation, keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

Die Substitution eines H-Atoms der Methylgruppe des Pyruvats durch einen unpolaren Phenylrest (Phenylpyruvat) hatte ebenso wenig einen Einfluß auf die Aktivität der DHDPA-Synthase wie die Einführung von polaren Gruppen mit negativer Ladung (Oxalacetat, α -Ketoglutarat), oder die Verlängerung der Kohlenstoffkette des Pyruvats um eine Methylgruppe (α -Ketobutyrat).

Der Einfluß der um ein C-Atom verkürzten Verbindung Glyoxylsäure und von Pyruvatanaloga mit veränderter Carbonylfunktion auf die enzymatische Aktivität der DHDPA-Synthase wurde nicht untersucht, jedoch berichten YAMAKURA et al (1974), daß das Enzym aus **B. subtilis** durch Glyoxylsäure gehemmt wird. Die DHDPA-Synthase aus **B. subtilis** wird außerdem auch durch Diketopimelinsäure gehemmt, und die Hemmung ist interessanterweise kompetitiv sowohl in Bezug auf Pyruvat als auch in Bezug auf ASA (YAMAKURA et al, 1974).

Im Gegensatz zu Pyruvatanaloga mit unmodifizierter Carboxylgruppe, die das Studium des Einflusses von Veränderungen am C-3 Atom des Substratmoleküls ermöglichen, eignen sich Verbindungen, in denen die Carboxylgruppe durch einen phosphorhaltigen Substituenten ersetzt ist, besonders zur Untersuchung von Ladungseinflüssen auf die Aktivität der DHDPA-Synthase.

Von den fünf hier untersuchten Pyruvatanaloga mit phosphorhaltigen Substituenten besitzt das monoanionische Acetylphosphinat die größte strukturelle Ähnlichkeit mit Pyruvat. Diese Substanz hatte von allen untersuchten Verbindungen den stärksten Einfluß auf die Aktivität der DHDPA-Synthase (Tab. 6). Die Hemmung durch Acetylphosphinat erwies sich als kompetitiv in Bezug auf Pyruvat. Aus der Auftragung der gemessenen Initialgeschwindigkeiten nach Dixon (Abb. 16) konnte die Hemmkonstante zu $K_i = 34 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Im Vergleich zum K_m -Wert für Pyruvat (0,57 mM) bedeutet dies, daß die Affinität des Inhibitors zum Enzym im Vergleich zum Substrat um etwa den Faktor 16 erhöht ist. Vorinkubation der DHDPA-Synthase mit Acetylphosphinat führte nicht zu einem zeitabhängigen Verlust der Enzymaktivität, so daß die Hemmung der DHDPA-Synthase durch Acetylphosphinat rein kompetitiver Natur ist und eine zu

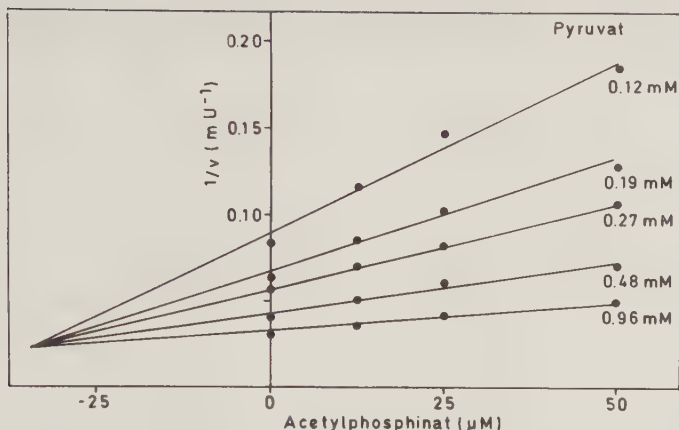


Abb. 16: Dixon-Diagramm der Hemmung der DHDPA-Synthase durch Acetylphosphinat

einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms führende Wechselwirkung des Inhibitors mit dem aktiven Zentrum der DHDPA-Synthase ausgeschlossen werden kann.

Acetylphosphonat, ein Pyruvatanalogon, bei dem die Carboxylgruppe durch eine dianionische Gruppe ersetzt ist, hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der DHDPA-Synthase. Das Vorhandensein einer einfach negativ geladenen funktionellen Gruppe scheint somit eine notwendige strukturelle Voraussetzung für einen möglichen Inhibitor der DHDPA-Synthase zu sein.

Diese Hypothese wird durch die Tatsache bekräftigt, daß Methylacetylphosphonat, der monoanionische Monomethylester des Acetylphosphonats, ein in Bezug auf Pyruvat kompetitiver Hemmstoff der DHDPA-Synthase ist. Der mittels eines Dixon-Diagramms für Methylacetylphosphonat ermittelte K_4 -Wert von 1,8 mM (Abb. 17) zeigt aber gleichzeitig, daß die Hemmwirkung dieser Substanz durch die im Vergleich mit Acetylphosphinat stark vergrößerte funktionelle Gruppe beträchtlich reduziert worden ist.

Eine weitere Vergrößerung der funktionellen Gruppe, wie im Ethylacetylphosphonat, führte zum vollständigen Verlust der inhibitorischen Fähigkeit des Moleküls.

Besitzt das Pyruvatanalogon keine negativ geladene funktionelle Gruppe, wie im Fall des Dimethylacetylphosphonats, so wird die Aktivität der DHDPA-Synthase auch nicht beeinflusst.

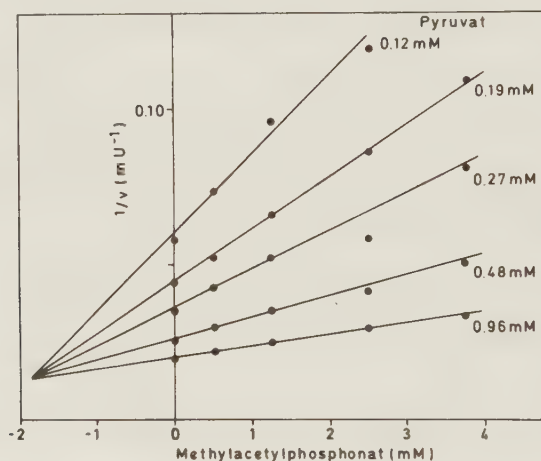


Abb. 17: Dixon-Diagramm der Hemmung der DHDPA-Synthase durch Methylacetylphosphonat

2.4. Dihydrodipicolinat Reduktase

Das Enzym Dihydrodipicolinat Reduktase (DHDPA-Reduktase) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Dihydrodipicolinsäure zu Tetrahydrodipicolinsäure, die mit L-2-Amino-6-ketopimelinsäure im Gleichgewicht steht (Abb. 18).

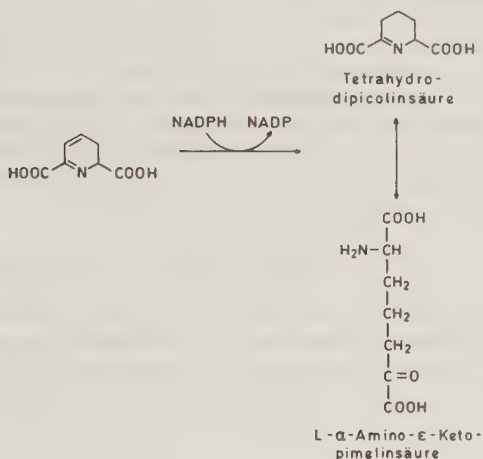


Abb. 18: Die Dihydrodipicolinat Reduktase-Reaktion

Aus der Tatsache, daß die Aktivität der DHDPA-Reduktase durch Dipicolin- und Isophthalsäure kompetitiv zu DHDPA gehemmt wird, zogen TAMIR und GILVARG (1974), die das Enzym reinigten und charakterisierten, den Schluß, daß das Substrat als heterocyclischer Ring an das aktive Zentrum des Enzyms bindet.

In *Escherichia coli* wird die DHDPA-Reduktase durch das **dap B** Gen codiert. Aus der Nucleotidsequenz dieses Gens, die für ein Polypeptid aus 273 Aminosäuren codiert, wurde das Molekulargewicht der DHDPA-Reduktase zu 28798 Dalton abgeleitet (BOUVIER et al, 1984).

DHDPA-Reduktasen sind auch aus Bakterien der Gattung **Bacillus** gereinigt worden (KIMURA, 1975; KIMURA und GOTO, 1977). Von diesen Enzymen nimmt die DHDPA-Reduktase aus **B. subtilis** eine Sonderstellung ein, weil sie FMN als prosthetische Gruppe trägt und Diaphoraseaktivität besitzt (KIMURA, 1975).

TYAGI et al (1983) konnten eine DHDPA-Reduktase auch in Höheren Pflanzen nachweisen, indem es ihnen gelang, in Enzymextrakten aus

E. coli-Mutanten mit fehlender DHDPA-Reduktase nach Zugabe von Rohextrakten aus Mais Diaminopimelat aus Pyruvat und Aspartat- β -Semialdehyd zu bilden. Nach partieller Reinigung konnte die Aktivität des Mais-Enzyms auch durch Messung der DHDPA-abhängigen Oxidation von NADPH bestimmt werden. Der Nachweis der kompetitiven Hemmung der Enzymaktivität durch Dipicolinsäure bestätigte die Identität des Enzyms.

Durch die in Tabelle 7 aufgeführte Abfolge von Reinigungsschritten gelang es, ausgehend von 36 g **E.coli** ATCC 9637, die DHDPA-Reduktase bei einer Ausbeute von 13% 278-fach anzureichern und 1,24 mg partiell gereinigtes Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 194,5 nkat/mg Protein zu isolieren.

	Protein (mg)	Ges.Akt. (nkat)	Spez.Akt. (nkat/mg)	Anrei- cherung (-fach)	Aus- beute (%)
Rohextrakt	2520	1850,0	0,7	1	100
Hitze-fällung	651	1816,7	2,8	4,0	98
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	115	750,0	6,5	9,3	41
DEAE-Sephrose	20	516,7	66,7	95,3	28
SUPEROSE	1,24	240,5	194,5	277,9	13

Tab. 7: Reinigung der DHDPA-Reduktase aus *E. coli* ATCC 9637

Die DHDPA-Reduktase entfaltet ihre größte enzymatische Aktivität bei einem pH-Wert um 6,7. Die apparente Michaelis-Konstante für DL-DHDPA wurde bei einer NADPH-Konzentration von 0,3 mM mit $K_m = 86 \mu\text{M}$ bestimmt.

Durch Gelfiltration an SUPEROSE konnte für die native DHDPA-Reduktase ein Molekulargewicht von 123 kD ermittelt werden, ein

Wert, der in etwa mit dem Literaturwert von 110 kD (TAMIR und GILVARG, 1974) übereinstimmt. Um das Molekulargewicht der Untereinheiten bestimmen zu können, wurde die nach dem in Tabelle 7 aufgezeigten Reinigungsverfahren isolierte DHDPA-Reduktase durch einen weiteren Reinigungsschritt, nämlich FPLC am Anionenaustauscher MONO Q, bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die gel-chromatographische Überprüfung der Reinheit dieser Enzympräparation durch SDS-PAGE zeigte, daß das gesamte auf das Gel aufgetragene Protein in einer einzigen Bande wanderte. Das Molekulargewicht der Untereinheit der DHDPA-Reduktase konnte aus diesem Gel mit etwa 25,5 kD bestimmt werden.

Daraus folgt, daß die native DHDPA-Reduktase aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut sein muß.

2.5. Diaminopimelat Dehydrogenase

Das Enzym meso- α,ϵ -Diaminopimelat D-Dehydrogenase (DAP-DH) katalysiert in Anwesenheit von NADP die reversible oxidative Abspaltung der Aminogruppe mit D-Konfiguration aus dem Substrat meso- α,ϵ -Diaminopimelinsäure. Als Produkte entstehen L- α -Amino- ϵ -ketopimelinsäure und NH_4^+ (Abb. 19).

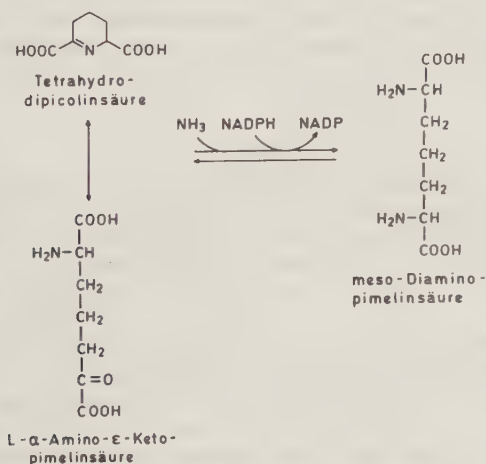


Abb. 19: Die Diaminopimelat Dehydrogenase-Reaktion

Das Enzym wurde zuerst in *Bacillus sphaericus* gefunden (MISONO et al, 1976) und ist seitdem in einer Reihe anderer Bakterien (MISONO et al, 1979; MISONO et al, 1986a) und in Höheren Pflanzen (WENKO et al, 1985) nachgewiesen worden. Die Entdeckung der DAP-DH führte zum Postulat einer neuen Variante des Diaminopimelinsäure-Weges, bei der weder acetylierte noch succinylierte Zwischenprodukte auftreten, sondern L- α -Amino- ϵ -ketopimelinsäure in einem einzigen Reaktionsschritt durch die DAP-DH direkt in meso-DAP umgewandelt wird (Abb. 1).

DAP-Dehydrogenasen sind aus *Bacillus sphaericus* (MISONO und SODA, 1980b), *Brevibacterium sp.* (MISONO et al, 1986b) und *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (MISONO et al, 1986a) gereinigt und charakterisiert worden. Eingehende Untersuchungen dieser Enzyme ergaben, daß sie alle ein Molekulargewicht von etwa 70000 Dalton besitzen und aus zwei identischen Untereinheiten mit je einer Bindestelle für NADPH bestehen. Alle bisher untersuchten DAP-Dehydrogenasen besitzen eine sehr hohe Substratspezifität und deaminieren außer meso-DAP nur noch Lanthionin (S-[2-Amino-2-carboxyethyl]-cystein), allerdings mit geringer Geschwindigkeit. LL- und DD-DAP dienen nicht als Substrat. Das pH-Optimum für die oxidative Deaminierung von meso-DAP liegt bei 10.5. Die reduktive Aminierung von α -Amino- ϵ -ketopimelat, bei der das pro-S-Wasserstoffatom am C-4 des Dihyronicotinamid Ringes von NADPH auf das Substrat übertragen wird, verläuft bei einem pH-Wert von 7,5 mit maximaler Geschwindigkeit.

Das Strukturgen der DAP-DH aus *C. glutamicum*, *ddh*, ist von ISHINO et al (1987) cloniert und sequenziert worden und codiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35142 Dalton.

Tabelle 8 gibt das Protokoll der Reinigung der DAP-DH ausgehend von etwa 7 g *C. glutamicum* ATCC 21488 wieder. Durch diese Abfolge von Reinigungsschritten konnte die DAP-DH mit einer Ausbeute von 24% 288-fach angereichert werden. Dabei wurden 0,35 mg Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 1255 nkat/mg Protein isoliert.

Zur Bestimmung der K_m -Werte von meso-DAP und NADP wurde in Abwesenheit von Reaktionsprodukten die Initialgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung in Abhängigkeit beider Substrate analysiert. Die doppelt reziproke Auftragung der bei verschiedenen festen Konzentrationen des zweiten Substrats gemessenen Initialgeschwindigkeit gegen die Konzentration des ersten Substrats ergab in beiden Fällen eine Geradenschar mit gemeinsamen Schnittpunkt auf der Abszisse (Abb. 20, Abb. 21).

	Protein (mg)	Ges. Akt. (nkat)	Spez. Akt. (nkat/mg)	Anrei- cherung (-fach)	Aus- beute (%)
Rohextrakt	421	1846	4,4	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung	209	1555	7,5	1,7	84
DEAE-Sepharose	37,1	1287	34,9	7,9	70
Hydroxyapatit	18,6	1161	62,3	14,2	63
Reactive Red	3,1	842	271,7	61,8	46
MONO Q	0,35	444	1255,6	288,4	24

Tab. 8: Reinigung der DAP-DH aus *C. glutamicum* ATCC 21488

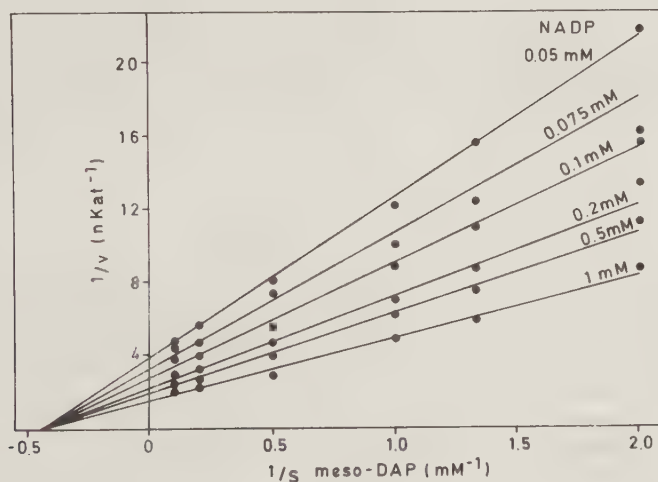


Abb. 20: Doppelt reziproke Auftragung der Initialgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung von meso-DAP gegen die meso-DAP-Konzentration bei verschiedenen konstanten NADP-Konzentrationen

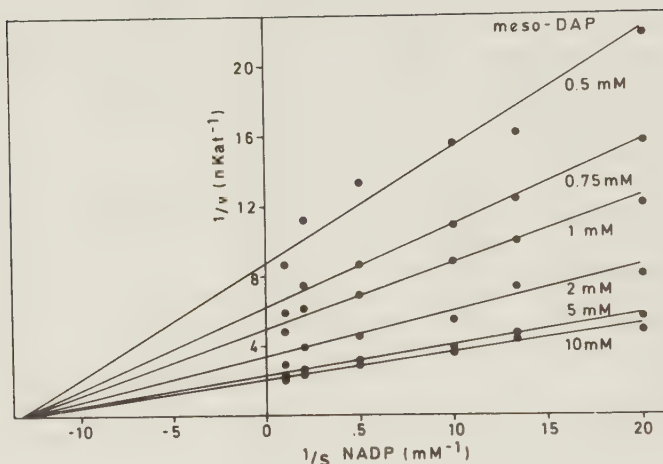


Abb. 21: Doppelt reziproke Auftragung der Initialgeschwindigkeit der oxidativen Deaminierung von meso-DAP gegen die NADP-Konzentration bei verschiedenen konstanten meso-DAP-Konzentrationen

Aus den Sekundäradiagrammen der y-Achsenabschnitte gegen die Kehrwerte der Konzentrationen des jeweils anderen Substrats wurden die Michaeliskonstanten zu $K_m = 90 \mu\text{M}$ für NADP (Abb. 22) und zu $K_m = 2,1 \text{ mM}$ für meso-DAP (Abb. 23) bestimmt. Hinsichtlich der Affinität zu seinen Substraten ähnelt das Enzym aus *C. glutamicum* ATCC 21488 den Enzymen aus *C. glutamicum* ATCC 13032 ($K_m[\text{NADP}] = 120 \mu\text{M}$, $K_m[\text{meso-DAP}] = 3.1 \text{ mM}$, MISONO et al, 1986a) und *Bacillus sphaericus* ($K_m[\text{NADP}] = 83 \mu\text{M}$, $K_m[\text{meso-DAP}] = 2,5 \text{ mM}$, MISONO und SODA, 1980b), unterscheidet sich aber recht deutlich von dem Enzym aus der nahe verwandten Gattung *Brevibacterium* ($K_m[\text{NADP}] = 140 \mu\text{M}$, $K_m[\text{meso-DAP}] = 6,25 \text{ mM}$, MISONO et al, 1986b).

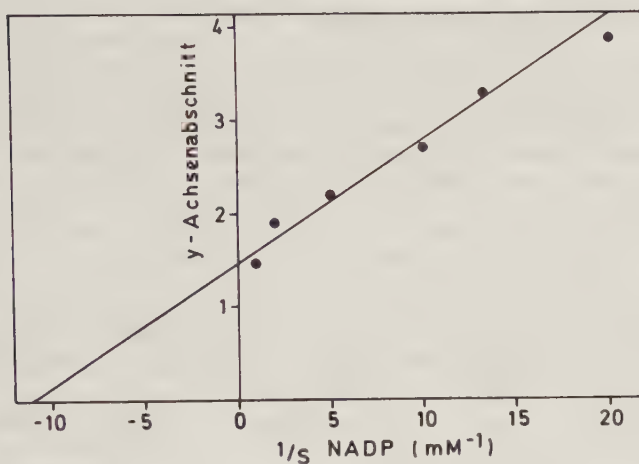


Abb. 22: Sekundärdiagramm zu Abb. 20. Abhängigkeit des y-Achsenabschnittes der in Abb. 20 erhaltenen Geraden vom Kehrwert der NADP-Konzentration

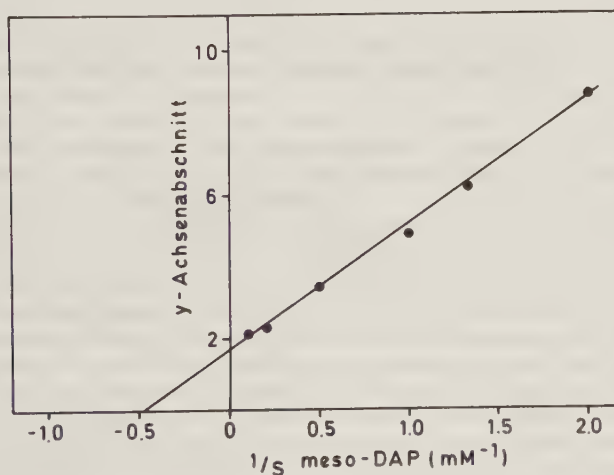


Abb. 23: Sekundärdiagramm zu Abb. 21. Abhängigkeit des y-Achsenabschnittes der in Abb. 21 erhaltenen Geraden vom Kehrwert der meso-DAP-Konzentration

2.6. Diaminopimelat Decarboxylase

Meso-Diaminopimelat D-Decarboxylase (DAP-DC) katalysiert die Decarboxylierung des R_D-Zentrums von meso-Diaminopimelinsäure. Als Produkt entsteht L-Lysin (Abb. 24). Die Reaktion ist spezifisch für das meso-Isomer der Diaminopimelinsäure und DD- und LL-Diaminopimelat sind weder Substrat noch wirksame Inhibitoren der Reaktion.

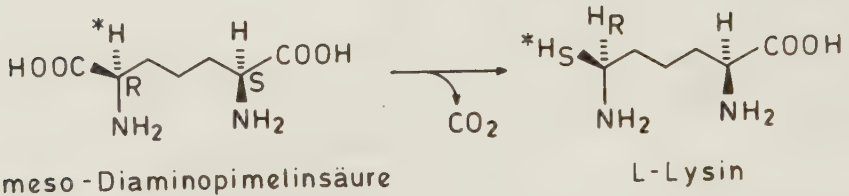


Abb. 24: Die Diaminopimelat Decarboxylase-Reaktion

Das Enzym aus **Bacillus sphaericus**, ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 80000 Dalton, wurde bis zur Homogenität gereinigt (ASADA et al, 1981a). DAP-Decarboxylasen sind außerdem aus verschiedenen Bakterien (DEWEY et al. 1954; WHITE und KELLY, 1965; NORTON und CHEN, 1970; ROSNER, 1975; LAKSHMAN et al. 1981) und aus Höheren Pflanzen (SHIMURA und VOGEL, 1966; VOGEL und HIRVONEN, 1971; SODEK, 1978; MAZELIS und CREVELING, 1978) isoliert worden. In Grünen Pflanzen ist das Enzym im Chloroplasten lokalisiert (MAZELIS et al. 1976).

Die Nucleotidsequenz von **lys A**, dem Strukturgen der DAP-DC, codiert in **Escherichia coli** für ein Protein aus 420 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 46099 Dalton (STRAGIER et al, 1983). Da das Molekulargewicht des nativen Enzyms etwa 200000 Dalton beträgt (WHITE und KELLY, 1965), besteht die DAP-DC von **E. coli** aus vier Untereinheiten, welche identisch sein müssen, da die Transformation von Säugetierzellen mit dem **lys A** Gen zur Expression eines katalytisch aktiven Proteins führt (JOUANNEAU et al, 1985).

Die DAP-Decarboxylasen sowohl aus Bakterien als auch aus Höheren Pflanzen benötigen Pyridoxalphosphat als Kofaktor und unterscheiden sich hinsichtlich des Reaktionsmechanismus der Decarboxylierung.

rung in zwei Punkten von allen anderen bisher untersuchten Aminosäure Decarboxylasen: Sie katalysieren zum einen die Abspaltung von CO_2 von einem α -Kohlenstoffatom mit D-Konfiguration im Substrat; zum anderen verläuft die Decarboxylierung unter Inversion der Konfiguration (ASADA et al, 1981b; KELLAND et al, 1985).

Da das Produkt der DAP-DC-Reaktion, L-Lysin, nicht nur für die Proteinbiosynthese, sondern auch für die Quervernetzung des Peptidoglykans bei Gram-positiven Bakterien benötigt wird, könnten sich Hemmstoffe der DAP-DC bei geringer Toxizität gegenüber Säuregetieren als tödlich für Bakterien erweisen. Aus diesem Grund besteht ein beständiges Interesse an spezifischen und hochwirksamen Inhibitoren der DAP-DC (GIRODEAU et al, 1986; KELLAND et al, 1986). Ein einfaches Reinigungsverfahren für das Enzym aus *E. coli* und eine schnelle und empfindliche Methode zur Messung der Enzymaktivität könnten die Suche nach neuen Inhibitoren wesentlich erleichtern.

Die Bestimmung der Aktivität der DAP-DC erfolgte bisher durch

- manometrische Messung des bei der Reaktion gebildeten CO_2 (WHITE und KELLY, 1965; PATTE et al, 1974)
- Messung der Abnahme der Konzentration des Substrats meso-DAP mittels einer modifizierten Ninhydrinreaktion (WHITE und KELLY, 1965)
- Messung des bei der Reaktion gebildeten L-Lysins mittels einer modifizierten Ninhydrinreaktion (SHIMURA und VOGEL, 1966) oder mit Hilfe des Enzyms L-Lysin α -Ketoglutarat ϵ -Aminotransferase (EC 2.6.1.36, SODA et al, 1978) oder
- Messung des aus (1,7- ^{14}C)-DAP freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ (ROSNER, 1975; MAZELIS et al, 1976; KELLAND et al, 1985).

Alle diese Testverfahren sind im allgemeinen sehr zeitaufwendig und nur wenig empfindlich und somit relativ ungenau, oder erfordern den Umgang mit radioaktiven Verbindungen, oder sind auf ein nicht kommerziell erhältliches Hilfsenzym angewiesen.

Da sich L-Lysin in Anwesenheit des Enzyms Saccharopin Dehydrogenase (EC 1.5.1.7) mit α -Ketoglutarat in einer NADH-abhängigen Reaktion spezifisch zu Saccharopin umsetzen (Abb. 25) und bestimmen läßt (NAKATANI et al, 1972), sollte diese Reaktion auch die Bestimmung des bei der DAP-DC-Reaktion gebildeten L-Lysins ermöglichen.

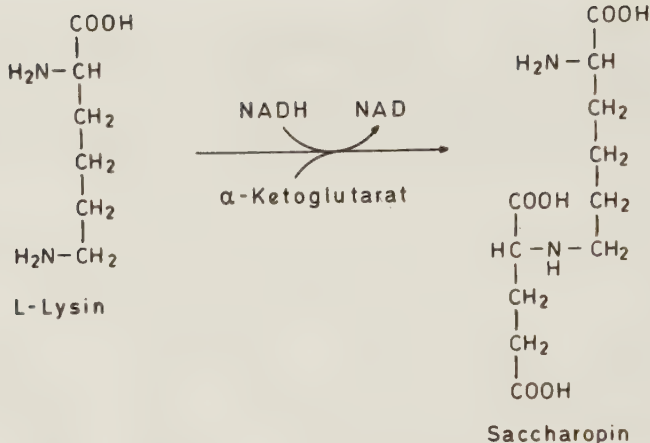


Abb. 25: Die Saccharopin Dehydrogenase-Reaktion

Diese Arbeit beschreibt eine schnelle und empfindliche spektrophotometrische Methode zur Bestimmung der Aktivität der DAP-DC unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Hilfsenzym Saccharopin Dehydrogenase.

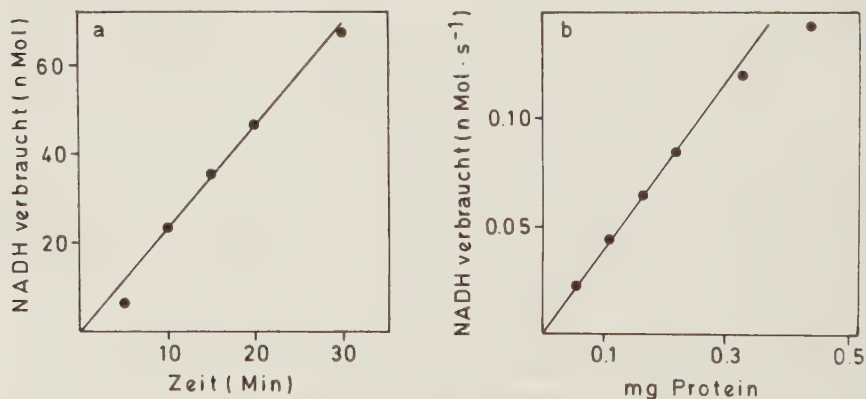


Abb. 26: Nichtkontinuierlicher Test. Zeitlicher Verlauf der Lysinbildung (a) und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration (b)

Die mit Hilfe des nichtkontinuierlichen spektrophotometrischen Tests bestimmte Aktivität der DAP-DC ist sowohl der Inkubationszeit als auch der eingesetzten Proteinmenge direkt proportional (Abb. 26).

Die mit diesem Test ermittelte Enzymaktivität und die mit anderen Testmethoden gemessenen Aktivitäten der DAP-DC sind nahezu identisch (Tab. 9).

Testmethode	DAP-DC Aktivität (nkat/mg)
Bestimmung des gebildeten Lysins mittels Saccharopin Dehydrogenase	0,41 ± 0,01
modifizierter Ninhydrintest	0,42 ± 0,02
Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$	0,41 ± 0,01

Tab. 9: Vergleich der mit dem nichtkontinuierlichen gekoppelten Test bestimmten Aktivität der DAP-DC mit den im modifizierten Ninhydrintest (SHIMURA und VOGEL, 1966) und durch Messung des aus (1,7- ^{14}C)-DAP freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ (KELLAND et al, 1985) gemessenen Enzymaktivitäten

Da im nichtkontinuierlichen Test vor der Bestimmung des gebildeten L-Lysins alle in der Probe enthaltenen Proteine durch die Hitzebehandlung denaturiert und inaktiviert werden, eignet sich dieser Test besonders zur Bestimmung der DAP-DC-Aktivität in Rohextrakten und unreinen Enzympräparationen, in denen bereits vor Substratzugabe NADH mit hoher Geschwindigkeit oxidiert wird.

In ganz oder teilweise gereinigten Enzympräparationen kann die Aktivität der DAP-DC in Anwesenheit der Saccharopin Dehydrogenase auch kontinuierlich gemessen werden. Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist nach einer kurzen lag-Phase linear. Die meßbare DAP-DC-Aktivität ist von der im Test eingesetzten Menge Saccharopin Dehydrogenase abhängig (Abb. 27). Wenn im Test das Verhältnis

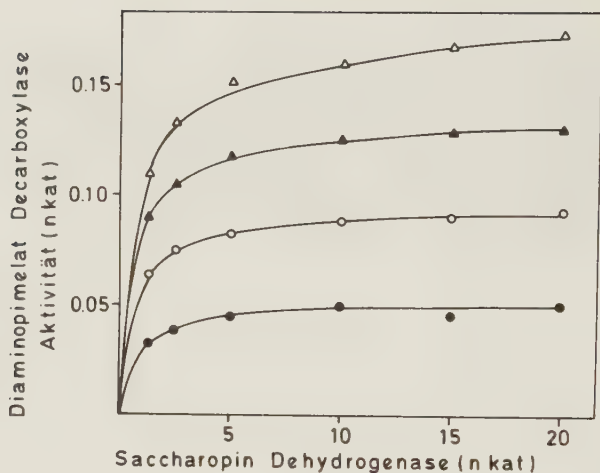


Abb. 27: Kontinuierlicher Test. Abhängigkeit der meßbaren DAP-DC-Aktivität von der im Test eingesetzten Menge Saccharopin Dehydrogenase (●—● 2,6 µg Protein, o—o 5,1 µg Protein, ▲—▲ 7,7 µg Protein, Δ—Δ 10,2 µg Protein)

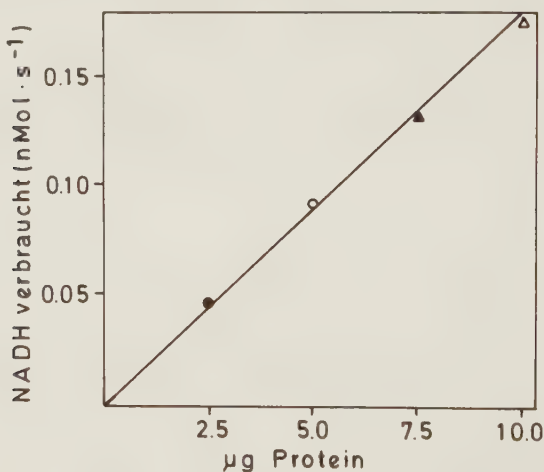


Abb. 28: Sekundärdiagramm zu Abb. 27. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der DAP-DC von der Enzymkonzentration (kontinuierlicher Test, Saccharopin Dehydrogenase nicht limitierend)

der Aktivitäten von Saccharopin Dehydrogenase zu DAP-DC größer als 200 ist, wird die meßbare Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch die Saccharopin Dehydrogenase limitiert. Unter diesen Voraussetzungen ist die Aktivität der DAP-DC der im Test eingesetzten Enzymmenge direkt proportional (Abb. 28).

Der hier beschriebene Test ist eine schnelle und empfindliche Methode zur Messung der Aktivität der DAP-DC. Die besonderen Vorteile dieses Tests liegen unter anderem in der Verwendung eines Hilfsenzym, welches im Handel erhältlich ist sowie im Verzicht auf den Einsatz radioaktiver Isotope.

Die Verwendung des beschriebenen Tests zur Messung anderer enzymatischer Reaktionen, bei denen L-Lysin als Produkt entsteht, z.B. bei der Reaktion der α -Amino- ϵ -caprolactam Hydrolase, erscheint möglich.

Das Protokoll einer Reinigung der DAP-DC, ausgehend von etwa 30 g Bakterien, ist in Tabelle 10 wiedergegeben. Durch dieses Reini-

	Protein (mg)	Ges.Akt. (nkat)	Spez.Akt. (nkat/mg)	Anrei- cherung (-fach)	Aus- beute (%)
Rohextrakt	2074	860,0	0,4	1	100
Protamin-/ Strepto- mycinsulfatfällung	2074	840,0	0,4	1	98
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	1115	785,0	0,7	2	91
Phenylsepharose	131	676,7	5,2	13	79
Hydroxyapatit	7,8	343,3	44,0	107	40
DEAE-Sepharose	2,3	251,7	109,4	267	29

Tab. 10: Reinigung der DAP-DC aus E. coli ATCC 9637

gungsverfahren konnte die DAP-DC mit einer Ausbeute von 29% 267-fach angereichert werden.

Der Versuch, das Enzym nach Abtrennung von exogenem Pyridoxal-phosphat mittels Gelfiltration durch Affinitätschromatographie an einer Säule, an die der Kofaktor der DAP-DC, Pyridoxalphosphat, als Ligand gebunden war, weiter zu reinigen, war erfolglos. Die DAP-DC, in Puffer G ohne Pyridoxalphosphat, band nicht an die Säule, wahrscheinlich weil der enzymgebundene Kofaktor durch die Gelfiltration nur in geringem Maße abgetrennt werden konnte.

Das pH-Optimum der Decarboxylierung von meso-DAP lag im Bereich von pH 7,3 - 7,5. Bei einer Pyridoxalphosphatkonzentration von 100 μM konnte der apparente K_m -Wert für meso-DAP zu 2,3 mM bestimmt werden.

Das Substratanalogon Lanthionin (S-[2-Amino-2-carboxyethyl]-cystein, Isomerenmischung) hemmte die DAP-DC kompetitiv in Bezug auf meso-DAP. Aus dem Dixon-Diagramm (Abb. 29) ergab sich ein K_i -Wert von 3,6 mM.

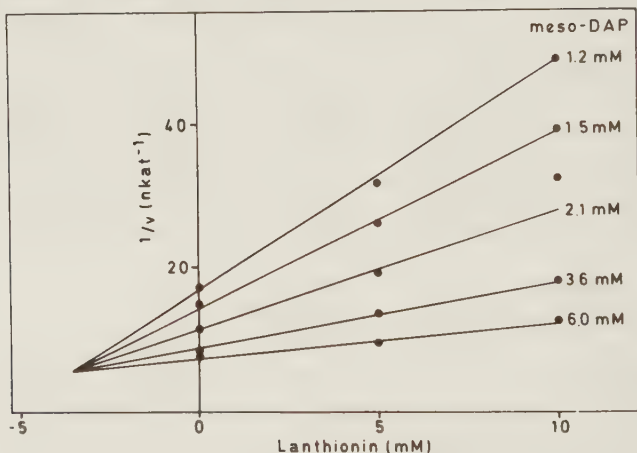


Abb. 29: Dixon-Diagramm der Hemmung der DAP-DC durch Lanthionin

3. Das in vitro-Testsystem

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie die Lysinbiosynthese über den Diaminopimelinsäureweg mit den Enzymen, deren Reinigung zuvor dargestellt wurde, **in vitro** rekonstituiert und wie der Fluß der Metabolite durch diesen Stoffwechselweg durch Messung der Umwandlung von Aspartat in Lysin verfolgt werden kann.

Anhand von Modelluntersuchungen wird demonstriert, daß dieses Modellsystem bei der Suche nach Inhibitoren der Lysinbiosynthese das in Abschnitt III.1. vorgestellte System ergänzen kann und zur weiteren Charakterisierung von Substanzen geeignet ist, die im **in vivo**-Test als Hemmstoffe der Lysinexkretion identifiziert wurden.

Untersuchungen an isolierten und gereinigten Enzymen zeigten, daß die Regulation der Lysinbiosynthese in der Zelle in den meisten Fällen auf der Stufe der Aspartat Kinase(n) und DHDPA-Synthase erfolgt. Die aus diesen Studien abgeleiteten Regulationsmechanismen standen im Einklang mit den Wachstumscharakteristika und den Nährstoffbedürfnissen der untersuchten Organismen. Es stellt sich aber die Frage, ob sich all diese Kontrollmechanismen auch innerhalb des metabolischen Systems der lebenden Zelle auswirken, da bei der Untersuchung der isolierten Enzyme im allgemeinen niedrige Enzymkonzentrationen und hohe Substratkonzentrationen verwendet werden, die Situation in der lebenden Zelle aber durch hohe Enzymkonzentrationen und niedrige steady-state Konzentrationen der Substrate gekennzeichnet ist (SZCZESIUL und WAMPLER, 1976). In den folgenden Abschnitten wird an einem Beispiel gezeigt, daß das hier vorgestellte **in vitro**-System auch einen Beitrag zur Analyse der Regulation der Lysinbiosynthese in der lebenden Zelle liefern kann.

3.1. Trennung von Substraten und Reaktionsprodukten

Aus der Verwendung von ^{14}C -markiertem Aspartat als Substrat für die **in vitro**-Lysinsynthese resultierte die Notwendigkeit, diese Aminosäure vor der Auswertung vom Reaktionsprodukt Lysin abzutrennen.

Die Trennung von Aspartat und Lysin gelang am einfachsten durch eindimensionale Chromatographie an Cellulose-Dünnschichtplatten und Entwicklung mit dem Laufmittel nach RUEPPEL et al (1977). Aspartat wanderte in diesem System mit einem R_F -Wert von 0,11, der R_F -Wert von Lysin betrug 0,41 (vgl. Abb. 32).

Das System hatte jedoch zwei Nachteile. Zum einen gelang es mit diesem Laufmittel nicht, Aspartat und Diaminopimelat zu trennen. Zum anderen verschmierten bei der Chromatographie von Proben aus dem Reaktionsansatz zur Lysinsynthese, die Proteine und große Salzmengen enthielten, die zu trennenden Substanzen derart, daß die für die quantitative Auswertung benötigte Trennung der Aminosäuren nicht erzielt werden konnte.

Beide Probleme ließen sich beseitigen, indem die Proben vor der Dünnschichtchromatographie über den Kationenaustauscher Dowex 50 WX8 nach der Vorschrift von NAKATANI et al (1972) vorgereinigt wurden. Mit dieser Methode wurden durch die Waschschrirte außer den störenden Salzen auch mindestens 99,3% des als Substrat verwendeten Aspartats abgetrennt. In Probeläufen enthielt das Eluat mindestens 96,6% des eingesetzten Lysins.

Diaminopimelat konnte durch die Waschschrirte nicht abgetrennt werden, sondern wurde zusammen mit Lysin vom Kationenaustauscher eluiert und anschließend dünn-schichtchromatographisch vom Lysin abgetrennt (gleicher R_f -Wert wie Aspartat).

3.2. Enzymkonzentrationen und Kofaktoren

Um die in der Zelle ablaufende Lysinsynthese **in vitro** realitätsnah nachvollziehen zu können, ist es im Prinzip erforderlich, das Verhältnis der Aktivitäten der an der Reaktion beteiligten Enzyme genau zu kennen. Auf diese genaue Abstimmung mußte bei dem hier vorgestellten System aber verzichtet werden, weil einerseits durch die Isolierung der Enzyme aus drei verschiedenen Organismen die im Rohextrakt gemessenen Enzymaktivitäten nicht in allen Organismen identisch waren und andererseits in der Literatur nur spärliche Angaben über die Verhältnisse der Aktivitäten der Enzyme der Lysinbiosynthese zueinander zu finden sind. Die Verwendung von Enzymen aus drei verschiedenen Organismen brachte weitere Schwierigkeiten mit sich, weil einige Faktoren, die gewöhnlich einen großen Einfluß auf die katalytische Aktivität von Enzymen haben, wie z.B. der pH-Wert, in diesem heterologen System nicht notwendigerweise optimal aufeinander abgestimmt werden konnten. Außerdem kommt es beim Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase bei Bakterien in der Regel zu signifikanten Veränderungen der intrazellulären Konzentrationen der an der Lysinsynthese beteiligten Enzyme (WHITE, 1983).

Letztlich wurden die einzelnen Enzyme in Anlehnung an die von WHITE (1983) für stationäre Zellen von **Bacillus sphaericus** NCTC 9602 bestimmten Aktivitäten miteinander kombiniert. Das Verhält-

nis der Aktivitäten von Aspartat Kinase, ASA-Dehydrogenase, DHDPA-Synthase, DHDPA-Reduktase, DAP-DH und DAP-DC betrug im Testansatz 1 : 3 : 2 : 1,9 : 4,2 : 1,5. Das Testsystem enthielt damit im Vergleich zu den von WHITE (1983) bestimmten Werten (1 : 2,7 : 0,7 : 2,1 : 41,0 : 5,5) eine etwas höhere Menge DHDFA-Synthase, wohingegen die Aktivitäten von DAP-DH und DAP-DC deutlich geringer waren.

Um sicherzugehen, daß die **in vitro**-Lysinsynthese auch bei längeren Inkubationszeiten mit konstanter Geschwindigkeit abläuft, wurden die Anfangskonzentrationen von Aspartat und ATP mit 20 mM sehr hoch angesetzt und außerdem ein NADPH regenerierendes System (Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) verwendet. Bei keinem der unten beschriebenen Versuche wurden mehr als 3% des angebotenen Aspartats in Lysin umgewandelt.

3.3. Zeitabhängigkeit der Lysinsynthese

Inkubation der sechs für die Lysinsynthese benötigten Enzyme mit den Substraten Aspartat und Pyruvat und den Kofaktoren Mg-ATP, NADPH, Ammoniumchlorid und Pyridoxalphosphat führte unter den beschriebenen Bedingungen zur Bildung von Lysin.

Unter den gegebenen Bedingungen war die Lysinsynthese mindestens 7 Stunden proportional zur Reaktionszeit (Abb. 30).

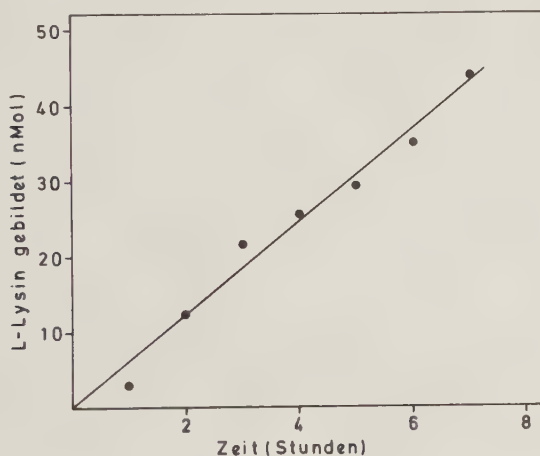


Abb. 30: Abhängigkeit der Lysinsynthese von der Zeit

Die Lysinsynthese erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1,5 pMol pro Sekunde und ließ sich mit einer Genauigkeit von mindestens $\pm 5\%$ reproduzieren.

Ohne NADPH oder bei Fehlen eines der beiden Substrate entstand kein Lysin.

Enthielt der Reaktionsansatz kein Pyridoxalphosphat, konnte keine Lysinsynthese nachgewiesen werden. Stattdessen wurde Diaminopimelat gebildet, und zwar mit der gleichen Geschwindigkeit, wie Lysin in Anwesenheit von Pyridoxalphosphat gebildet wurde.

3.4. pH-Optimum der Lysinsynthese

Die Reaktionsgeschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen wird im allgemeinen stark vom pH-Wert des Reaktionsmediums beeinflusst, da Änderungen des pH-Wertes Änderungen des Ionisationsgrades von geladenen Gruppen sowohl der Substrate als auch der an der Katalyse beteiligten funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum der Enzyme zur Folge haben können.

Bei der hier untersuchten Mehrenzymreaktion sind zudem die pH-Optima der einzelnen Komponenten des Systems für das pH-Optimum der Gesamtreaktion von entscheidender Bedeutung.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der Lysinsynthese wurde nur in HEPES-Puffer untersucht, da einerseits dieses Puffersystem den gesamten Bereich der pH-Optima der an der Reaktion beteiligten Enzyme abdeckte, andererseits die Natur der Pufferionen einen ausgeprägten Einfluß auf die Geschwindigkeit der Lysinsynthese hatte. Wurde der HEPES-Puffer z.B. durch Phosphatpuffer mit gleichem pH-Wert ersetzt, konnte keine Lysinsynthese gemessen werden.

Alle angegebenen Aktivitäten wurden in der linearen Phase der Reaktion ermittelt, so daß eine pH-abhängige Denaturierung eines der an der Lysinsynthese beteiligten Enzyme ausgeschlossen werden konnte.

Das pH-Profil der Lysinsynthese ist in Abbildung 31 dargestellt. Die Gesamtreaktion verlief bei pH = 8,0 mit maximaler Geschwindigkeit.

Sank der pH-Wert unter 7,7, nahm die Geschwindigkeit der Lysinsynthese schnell ab. Bei pH-Werten von 7,4 und niedriger war zudem ein Anstieg der Diaminopimelatmenge zu beobachten, so daß bei diesen pH-Werten die Geschwindigkeit der Lysinbildung offensichtlich durch die Aktivität der DAP-DC (pH-Optimum bei 7,3 - 7,5, vgl. III.2.6.2.) begrenzt wurde.

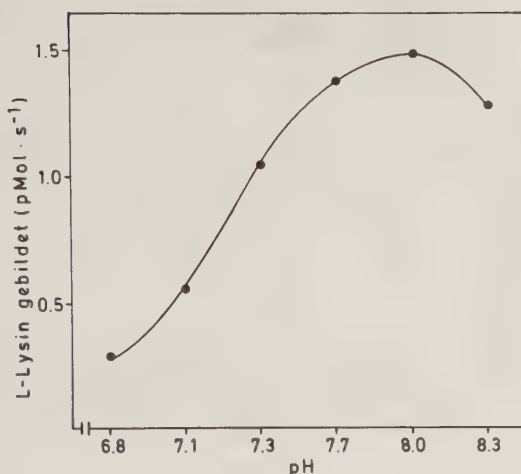


Abb. 31: Abhängigkeit der Lysinsynthese vom pH-Wert

3.5. Authentizität des gebildeten Lysins

Der Nachweis, daß bei der oben beschriebenen Reaktion als Produkt tatsächlich L-Lysin gebildet und mittels Ionenaustauschchromatographie aus dem Testansatz isoliert wurde, konnte mittels dreier verschiedener Methoden erbracht werden.

Erstens konnte gezeigt werden, daß durchschnittlich mindestens 70% der vom Kationenaustauscher eluierten radioaktiven Substanzen bei der dünnsschichtchromatographischen Auftrennung die gleiche relative Beweglichkeit wie L-Lysin besaßen (Abb. 32). Außerdem waren die Flecken der auf dem Dünnschichtchromatogramm durch Entwicklung mit Ninhydrin sichtbar gemachten Aminosäuren und die Flecken der durch Autoradiographie sichtbar gemachten radioaktiven Verbindungen deckungsgleich.

Zweitens wurden die vom Kationenaustauscher eluierten Substanzen zusammen mit einem Aminosäurenstandard auf einem automatischen Aminosäurenanalysator getrennt. Das Ergebnis dieser Analyse zeigt Abbildung 33. Dem Elutionsdiagramm ist zu entnehmen, daß eine Ninhydrin-positive Substanz sowie 83,8% der Radioaktivität mit dem authentischen L-Lysin cochromatographierten. Die restlichen 16,2% der Radioaktivität verteilten sich auf Aspartat (2,2%), Homoserin (1,7%), Diaminopimelat (2,7%) und drei nicht identifi-

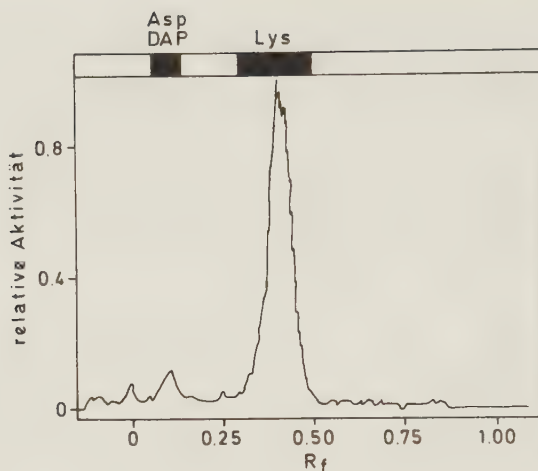


Abb. 32: Verteilung der Radioaktivität der Umsatzprodukte im Ansatz zur Lysinsynthese. Der Reaktionsansatz wurde über Dowex 50 WX8 getrennt und das eingeeingte Eluat auf einer Cellulose-Dünnschichtplatte im Laufmittel nach RUEPPEL et al (1977) entwickelt.

zierte Substanzen (zusammen 6,5%), bzw. eluierten nicht als definierte Peaks (3,1%). Bei dieser Analyse wurde insgesamt etwa 85% der eingesetzten Radioaktivität in den aufgefangenen Fraktionen wiedergefunden.

Drittens reagierten etwa 70% der vom Kationenaustauscher eluierten radioaktiven Verbindungen in Anwesenheit des Enzyms Saccharopin Dehydrogenase unter NADH-Verbrauch mit α -Ketoglutarat (vgl. III.2.6.1). Da dieses Enzym eine hohe Substratspezifität besitzt und nicht in der Lage ist, D-Lysin oder eine andere Aminosäure umzusetzen (SAUNDERS und BROQUIST, 1966; FUJIOKA und NAKATANI, 1970), muß diese Reaktion als Beweis dafür angesehen werden, daß es sich bei dem im *in vitro*-System gebildeten Lysin tatsächlich um L-Lysin handelt. Die Menge Lysin, die aus dem NADH-Verbrauch errechnet wurde, entsprach im Rahmen der Meßgenauigkeit der Menge des aus der Radioaktivität errechneten Lysins.

Durch diese drei Testverfahren konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, daß in dem *in vitro*-System unter den angegebenen Bedingungen aus L-(^{14}C)-Aspartat L-(^{14}C)-Lysin gebildet wurde.

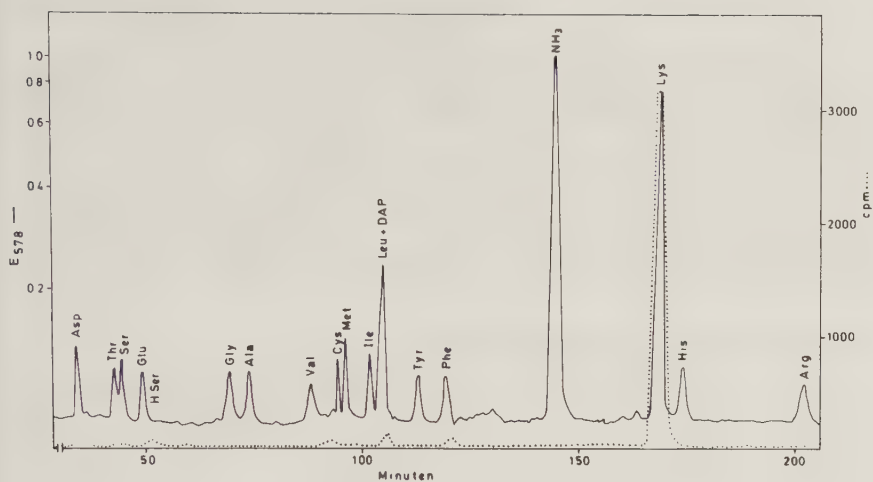


Abb. 33: Elutionsdiagramm der Aminosäurenanalyse

	Lysin gebildet (%)
Kontrolle	100
5 mM L-Lys	87
5 mM L-Thr	57
5 mM L-Lys + 5 mM L-Thr	10

Tab. 12: Feedback-Hemmung der Lysinsynthese

3.6. Feedback-Hemmung

Da die Aktivität der hier verwendeten Aspartat Kinase durch L-Lysin und L-Threonin reguliert wird (vgl. III.2.1.1.), sollte sich auch die *in vitro*-Lysinsynthese durch diese beiden Aminosäuren regulieren lassen.

Der Einfluß der Aminosäuren Lysin und Threonin auf die Lysinsynthese ist in Tabelle 12 zusammengefaßt. L-Lysin alleine reduzierte die Lysinmenge nur geringfügig. L-Threonin verringerte die Menge des gebildeten Lysins um 43%. In Anwesenheit beider Aminosäuren kam es zu einer um 90% verringerten Lysinsynthese.

3.7. Hemmung durch Acetylphosphinat

Acetylphosphinat hatte sich bei der Untersuchung der Substratspezifität der DHDPA-Synthase als wirkungsvoller kompetitiver Inhibitor der Kondensationsreaktion erwiesen (vgl. III.2.3.2.). Aus diesem Grund müßte Acetylphosphinat auch einen inhibitorischen Einfluß auf die Lysinsynthese ausüben können.

Wie aus den in Tabelle 13 gezeigten Ergebnissen zu ersehen ist, kam es in Anwesenheit von Acetylphosphinat zu einer Reduktion der Lysinsynthese. 5 mM Acetylphosphinat hemmten die Lysinsynthese aber nur um 28%, obwohl bei dieser Inhibitorkonzentration die Aktivität der DHDPA-Synthase um 91% verringert wurde (Tab. 6).

Acetylphosphinat (mM)	Lysin gebildet (%)
0	100
1	87
5	72
20	36

Tab. 13: Hemmung der Lysinsynthese durch Acetylphosphinat

3.8. Hemmung durch CGA-Verbindungen

In Kapitel III.1. wurden sechs verschiedene CGA-Verbindungen vorgestellt, die sowohl die Lysinausscheidung von *C. glutamicum* ATCC 21488 hemmten, als auch im Agardiffusionstest wachstumshemmende Wirkung gegen mindestens einen der beiden Testorganismen besaßen. Um zu klären, ob es sich bei einer dieser Verbindungen um einen Hemmstoff der Lysinbiosynthese handelt, wurde hier ihr Einfluß auf die *in vitro*-Lysinsynthese analysiert.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist zusammen mit den in III.1. erarbeiteten Ergebnissen der *in vivo*-Tests in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Es zeigte sich, daß die beiden Verbindungen, die ausschließlich das Wachstum von *S. cerevisiae* hemmten, keinen Einfluß auf das *in vitro*-Testsystem hatten.

Verbindung	Hemmung der Lysinaus- scheidung (pI ₅₀)	Wachstums- hemmung		Lysin gebildet (%)
		<i>E. coli</i>	<i>S. cer.</i>	
CGA 127990	4,80	-	+	102
CGA 71818	4,58	-	+	111
CGA 214519	3,63	+	-	97
CGA 47480	3,62	+	-	83
CGA 214858	4,07	+	+	90
CGA 86817	4,89	+	+	88

Tab. 14: Einfluß von 6 verschiedenen CGA-Verbindungen auf die Lysinausscheidung von ATCC 21488 (in vivo-Test; pI₅₀-Werte), auf die Lysinsynthese (in vitro-Test; 0,1 mM Inhibitorkonzentration) und ihre wachstumshemmende Wirkung im Agardiffusionstest (0,5 µMol/Test)

Die beiden Verbindungen, die sowohl *E. coli* als auch *S. cerevisiae* im Wachstum hemmten, hatten nur einen relativ geringen Einfluß auf die Lysinsynthese.

Von den Verbindungen, die ausschließlich das Wachstum von *E. coli* hemmten, hatte CGA 214519 keinen Einfluß auf die Lysinsynthese. CGA 47480 hatte mit einer Reduktion der Lysinsynthese um 17% von allen untersuchten Verbindungen den größten Einfluß auf das *in vitro*-System. Wie die Ergebnisse der Untersuchung von Acetylphosphinat (III.3.8.) zeigten, kann ein derartiger Grad der Hemmwirkung durchaus die effektive Hemmung eines an der Lysinbiosynthese beteiligten Enzyms widerspiegeln. Um dies zu klären, wurde die Wirkung von CGA 47480 auf die isolierten Enzyme der Lysinsynthese untersucht.

Das Ergebnis ist in Tabelle 15 zusammengefaßt und belegt, daß keines der isolierten Enzyme der Lysinsynthese durch CGA 47480 gehemmt wird.

Enzym	Aktivität (in % der Kontrolle)
Aspartat Kinase	100
ASA Dehydrogenase	100
DHDPA Synthase	98
DHDPA Reduktase	100
DAP Dehydrogenase	100
DAP Decarboxylase	96

Tab. 15: Hemmung der isolierten Enzyme der Lysinsynthese durch CGA 47480

Bei allen Messungen betrug die Inhibitorkonzentration 0,1 mM. Die Messung der einzelnen Enzyme erfolgte wie unter II.10. beschrieben, die Aktivität der Kontrolle wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

IV. Diskussion

1. Das in vivo-Testsystem

Ein gesteigertes ökologisches Bewußtsein beeinflusste in den letzten Jahren zunehmend die Forschungsanstrengungen auf dem Pflanzenschutzsektor. Ein direktes Forschungsziel ist daher die Suche nach Herbiziden geworden, die die geforderten Wirkungen mit einem Mindestmaß an unerwünschten Nebenwirkungen erzielen. Als besonders attraktive Angriffspunkte für Herbizide haben sich Stoffwechselwege erwiesen, die ausschließlich bei Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen. Man kann erwarten, daß Wirkstoffe, die diese Wege gezielt hemmen, in ihrer Wirkung tatsächlich auf Pflanzen und Mikroorganismen begrenzt sind und damit ökologische und toxikologische Vorteile bieten. Aus diesem Grund haben neben Hemmstoffen des photosynthetischen Elektronentransports in den letzten Jahren Herbizide, die in die Biosynthese essentieller Aminosäuren eingreifen, eine stetig größer werdende kommerzielle Bedeutung erlangt.

Trotz des steigenden Bedarfs an modernen Herbiziden entdeckt man auch heute noch neue Herbizide mehr oder weniger zufällig. So müssen gegenwärtig durchschnittlich etwa 10000 Verbindungen synthetisiert werden, um einen einzigen in der Praxis verwertbaren herbiziden Wirkstoff zu finden.

Um aus dieser riesigen Anzahl von synthetisierten Chemikalien die aktiven Verbindungen auszulesen, benutzt man in der Regel einen Standardsatz von monokotylen und dikotylen Pflanzen, auf die die zu prüfenden Substanzen aufgebracht werden. Nach bestimmten Zeiten werden die Effekte beobachtet und ausgewertet.

Diese Ganzpflanzentests erlauben eine recht sichere Beurteilung der herbiziden Potenz der untersuchten Verbindungen, da die Aussagen mit Hilfe von verschiedenartigen Testpflanzen gewonnen werden. Der hiermit verbundene Aufwand ist jedoch beträchtlich. Außerdem haben diese Tests nur eine geringe Aussagefähigkeit bezüglich des Wirkortes eines Inhibitors. Aus diesem Grund sind bei der Suche nach neuen Herbiziden mit pflanzenspezifischen Biosynthesewegen als Wirkort Testsysteme von hohem praktischen Interesse, die die Möglichkeit bieten, den Wirkmechanismus interessanter Chemikalien zu einem frühen Zeitpunkt des Screenings einfach und sicher zu beurteilen.

In dieser Arbeit wurde deshalb der Versuch unternommen, den heutzutage verwendeten Tests ein Testsystem zur Seite zu stellen, das den gezielten Nachweis von Hemmstoffen der Biosynthese der essen-

tiellen Aminosäure Lysin zu einem frühen Zeitpunkt des Herbizid-screenings ermöglichen soll.

Als Versuchsobjekt für den *in vivo*-Test diente *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21488, ein L-Methionin-auxotropher Organismus mit der Fähigkeit zur simultanen Überproduktion der Aminosäuren L-Lysin und L-Threonin.

Dieses Bakterium wurde für die hier durchgeführten Untersuchungen ausgewählt, weil es, auf Grund seiner Fähigkeit zur Aminosäuren-überproduktion, Lysin in so großer Menge ins Medium ausscheidet, daß diese Aminosäure mit einem einfachen enzymatischen Test schnell und quantitativ bestimmt werden kann. Das ausgeschiedene Lysin ist zudem das Endprodukt eines Biosyntheseweges und wird *de novo* synthetisiert, so daß seine Menge als Maß für den Stoffdurchsatz durch den Lysinbiosyntheseweg verwendet werden kann.

Um antagonistische Effekte zwischen potentiellen Hemmstoffen und im Medium enthaltenen niedermolekularen Verbindungen von vornherein auszuschließen, wurde ein für diese Bakterien geeignetes Minimalmedium entwickelt (II.1.).

Die Methionin-Auxotrophie von ATCC 21488 bot zudem die Möglichkeit, die Lysinproduktion unabhängig von Wachstum und Vermehrung der Bakterien ablaufen zu lassen (Abb. 3). Die Lysinbiosynthese wurde so zu einem der dominierenden Stoffwechselprozesse in der Bakterienzelle gemacht. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, daß Verbindungen, die Nukleinsäure-, Protein- oder Zellwandbiosynthese beeinflussen, als Inhibitoren der Lysinexkretion in möglichst geringem Maße in Erscheinung treten.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Substanzen gefunden, die in der Lage waren, die Lysinausscheidung von ATCC 21488 zu hemmen. Auftragung der Hemmwirkung gegen die Hemmstoffkonzentration ergab typische Hemmkurven (Abb.4), aus denen diejenige Inhibitorkonzentration bestimmt werden konnte, die zur Hemmung der Lysinexkretion um 50% nötig war. Als pI_{50} -Wert ausgedrückt, ist sie ein direktes Maß für die inhibitorische Potenz der untersuchten Verbindung und daher zum Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Substanzen geeignet. Zur Interpretation der Ergebnisse kann zusätzlich zum pI_{50} -Wert die Steilheit der Hemmkurve herangezogen werden, da eine stark abgeflachte Hemmkurve im allgemeinen auf eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Inhibitor und untersuchtem Stoffwechselprozess hindeutet.

Es stellt sich die Frage, ob die im *in vivo*-Test als wirksam erkannten Verbindungen auch tatsächlich ein Enzym des Diaminopipi-

metatweges hemmen, oder ob bevorzugt Wechselwirkungen mit anderen metabolischen Prozessen für die beobachtete Wirkung verantwortlich gemacht werden müssen.

Für die zweite Annahme spricht die Komplexizität der Vorgänge, die bei Corynebacterien am Glucoseabbau, an der Lysinbiosynthese und an der Lysinausscheidung beteiligt sind.

YAMAGUCHI et al (1986) konnten zeigen, daß der Glucose-Abbau bei Lysin-produzierenden Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* zu etwa gleichen Teilen über Glycolyse (Fructose-1,6-bisphosphat-Weg, 56%) und Pentosephosphat-Weg (44%) erfolgt. Die Lysinbiosynthese erfolgt, vom Aspartat ausgehend, sowohl über LL-Diaminopimelat (60 - 70%) als auch unter Mitwirkung der Diaminopimelat Dehydrogenase (30 - 40%).

Trotz der Verwendung von nicht wachsenden Bakterien ist somit immer noch eine Vielzahl von Enzymen direkt und indirekt an der Lysinsynthese beteiligt. Sie alle können durch die zu testende Substanz beeinflusst werden, so daß es letztlich auch zu einer Verringerung der Lysinproduktion kommen kann, ohne daß ein Enzym des Diaminopimelinsäureweges Wirkort des Inhibitors ist.

Problematisch ist weiterhin die Abhängigkeit der Lysinausscheidung vom Biotingehalt des Kulturmediums. Der Biotingehalt des Mediums beeinflusst nämlich die Lipidzusammensetzung der bakteriellen Cytoplasmamembran und damit ihre Permeabilität für Aminosäuren (HIROSE et al, 1985).

Bei der Untersuchung von lipophilen Molekülen ist aber nicht auszuschließen, daß diese durch Interaktionen mit den Lipiden der Cytoplasmamembran ebenfalls deren Permeabilität beeinflussen und durch Hemmung der Lysinexkretion eine Hemmung der Lysinsynthese vortäuschen.

Die hier angeführten Gründe, die sicherlich noch durch weitere Argumente ergänzt werden können, sprechen dafür, daß die Mehrzahl der im *in vivo*-Test als wirksam erkannten Verbindungen keine spezifischen Inhibitoren der Lysinbiosynthese sind.

Deshalb wurde versucht, den *in vivo*-Test durch einen zweiten Test mit intakten Organismen sinnvoll zu ergänzen.

In der Natur wird Lysin entweder über den Diaminopimelinsäureweg aus Aspartat, oder über den α -Aminoadipinsäureweg aus α -Ketoglutarat synthetisiert. Die Existenz dieser beiden unterschiedlichen Biosynthesewege kann ausgenutzt werden, um mittels eines einfachen Agardiffusionstests einen zusätzlichen Hinweis bezüglich des Wirkortes eines Hemmstoffes der Lysinexkretion zu erhalten.

Eine Substanz, die eine Reaktion des Diaminopimelinsäureweges

hemmt, sollte nämlich das Wachstum eines Organismus, der Lysin über den α -Aminoadipinsäureweg bildet, z.B. einer Hefe, nicht beeinflussen (Ausnahmen: Hemmung von Aspartat Kinase und Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase). Umgekehrt sollte ein Inhibitor, der ein Enzym des Diaminopimelinsäureweges hemmt, ausschließlich das Wachstum eines Bakteriums, das Lysin über diesen Weg synthetisiert, oder das Wachstum beider Testorganismen, hemmen. Verbindungen, die ausschließlich das Wachstum der Hefe beeinflussen, sollten auf Grund dieser Überlegungen von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden können.

In dieser Arbeit wurde routinemäßig die wachstumshemmende Wirkung von Hemmstoffen der Lysinexkretion im Agardiffusionstest bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß die Mehrzahl (70%) der 30 untersuchten Verbindungen ausschließlich das Wachstum der Hefe, die Lysin über den α -Aminoadipinsäureweg synthetisiert, hemmten. 23% der Verbindungen hemmten das Wachstum beider Testorganismen und nur 7% erwiesen sich ausschließlich als Inhibitoren des Wachstums von *E. coli*.

Die Tatsache, daß nur auf das Wachstum der Hefe wirkende Verbindungen zahlenmäßig dominieren, deutet darauf hin, daß mit dem **in vivo**-Test, trotz der angestrebten Verringerung der während der Lysinsynthese ablaufenden Stoffwechselprozesse, eine große Zahl von Verbindungen als wirksam erkannt wird, die nicht spezifisch die Lysinsynthese hemmen, sondern auf andere Stoffwechselprozesse einwirken.

Ob alle ausschließlich das Wachstum der Hefe hemmenden Chemikalien mit Sicherheit nicht die Lysinsynthese über den Diaminopimelatweg beeinflussen und deshalb bei der Suche nach neuen Inhibitoren der Lysinsynthese als unwirksam ausselektioniert werden dürfen, wird sich erst dann klären lassen, wenn ein spezifisch in die Lysinbiosynthese eingreifender Inhibitor gefunden worden ist, dessen Auswirkungen auf das **in vivo**-System analysiert werden können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der in dieser Arbeit vorgestellte **in vivo**-Test einfach zu handhaben ist und nur eine kurze Vorbereitungszeit und wenig Platz benötigt. Die Durchführung des Tests ist zudem wenig zeitaufwendig und die Frage, ob eine Substanz wirksam ist, läßt sich innerhalb von ein bis zwei Tagen beantworten. Es muß aber auch gesagt werden, daß dieser Test, selbst wenn er durch den Agardiffusionstest ergänzt wird, nicht ausreichend ist, um einen möglichen Hemmstoff der Lysinbiosynthese sicher zu identifizieren. Wegen der oben diskutierten Gründe werden die meisten der mit diesem Test gefundenen aktiven

Verbindungen keine spezifischen Inhibitoren der Lysinbiosynthese sein. Um diese mit Sicherheit identifizieren zu können, ist es erforderlich, die im **in vivo**-Test als wirksam erkannten Verbindungen auch im **in vitro**-Test auf ihre inhibitorische Aktivität zu untersuchen.

Bevor näher auf den **in vitro**-Test eingegangen wird, sollen aber erst einige Eigenschaften der Enzyme des Diaminopimelinsäureweges diskutiert werden.

2. Untersuchungen an den Enzymen des Diaminopimelinsäure-Weges

Aspartat Kinase, das erste Enzym des Lysinbiosyntheseweges, wurde aus **Pseudomonas fluorescens** isoliert. Da die Aspartat Kinase im **in vitro**-System zur Lysinsynthese verwendet werden sollte, waren folgende Gründe für diese Wahl ausschlaggebend:

- Ihre Enzymaktivität sollte nicht durch Lysin allein hemmbar sein, um auch in Gegenwart höherer Lysinkonzentrationen eine konstante Enzymaktivität zu garantieren.
- Eine andere Aminosäure, allein oder in Kombination mit Lysin, sollte die Aspartat Kinase hemmen, weil dann trotz des Fehlens von spezifischen Inhibitoren der Lysinsynthese die Möglichkeit gegeben ist, den Einfluß eines Hemmstoffes auf die Lysinsynthese zu simulieren.
- In dem zur Isolierung des Enzyms verwendeten Organismus sollten keine Isoenzyme der Aspartat Kinase vorkommen, um im **in vitro**-Test komplexe Regulations- und Hemmeffekte von vornherein auszuschließen.
- Die verwendete Aspartat Kinase sollte außerdem keine Homoserin Dehydrogenase-Aktivität besitzen, damit der im Verlauf der Reaktion gebildete Aspartat- β -Semialdehyd nicht zum Teil in Homoserin umgewandelt und so der zum Lysin führenden Reaktionssequenz entzogen wird.

Auf Grund dieser Anforderungen waren weder die Enzyme aus **E. coli**, noch die Enzyme aus **Bacillus** Arten für einen Einsatz in einem Testsystem zum Nachweis möglicher Inhibitoren der Lysinsynthese geeignet.

Ein Enzym, das alle gewünschten Eigenschaften besitzt, ist hingegen die Aspartat Kinase aus **Pseudomonas fluorescens**. Die Reinigung dieses Enzyms und seine enzymologischen und regulatorischen Eigenschaften wurden bereits von DUNGAN und DATTA (1973a, 1973b) beschrieben.

In dieser Arbeit gelang im Verlauf der Enzymreinigung die gewünschte Abtrennung der Aspartat Kinase von der Homoserin Dehydrogenase nahezu vollständig (III.2.1.1.). Die Regulation der

Aspartat Kinase-Aktivität erfolgte, wie in der Literatur (DUNGAN und DATTA, 1973a) beschrieben, durch die gemeinsame Einwirkung von L-Lysin und L-Threonin (Tab. 3).

Die Aspartat Kinase aus **P. fluorescens** erwies sich somit als das für die Rekonstitution der Lysinsynthese am besten geeignete Enzym. Der einzige aus dieser Wahl resultierende Nachteil ist, daß das **in vitro**-System letztlich aus Enzymen von drei verschiedenen Bakterienarten zusammengesetzt und damit sehr heterolog ist.

Für die Verwendung der Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase im **in vitro**-System zur Lysinsynthese ist von Bedeutung, daß sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion dieses Enzyms durch hohe Konzentrationen an Ammoniumionen gehemmt wurden (Abb. 7). Da Ammoniumionen Substrat der Diaminopimelat Dehydrogenase sind, mußte deren Konzentration im **in vitro**-System so gewählt werden, daß die Diaminopimelatsynthese mit möglichst hoher Geschwindigkeit erfolgen konnte, ohne daß gleichzeitig die ASA-DH gehemmt wurde. Die Ursachen für die Hemmung der ASA-DH durch Ammoniumionen wurden, da sie für die Fragestellungen dieser Arbeit nicht von unmittelbarem Interesse waren, nicht näher untersucht.

Zur kinetischen Charakterisierung des Reaktionsmechanismus der Dihydrodipicolinat Synthase wurde eine Serie enzymkinetischer Messungen durchgeführt. Die doppelt reziproke Auftragung der gemessenen Initialgeschwindigkeiten nach Lineweaver-Burk ergab Geradenscharen ohne gemeinsamen Schnittpunkt (Abb. 9, Abb. 10). Das bedeutet, daß die Kondensationsreaktion über einen Ping-Pong Mechanismus abläuft (III.2.3.1.). Pyruvat bindet dabei als erstes Substrat an das Enzym und bildet mit einer Aminogruppe im aktiven Zentrum unter Wasserabspaltung eine Schiff'sche Base aus (Abb. 13). Für die Richtigkeit dieses Mechanismus spricht, daß eine Schiff'sche Base zwischen Pyruvat und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes als Zwischenprodukt der Kondensationsreaktion bei der DHDPA-Synthase aus **E. coli** nachgewiesen werden konnte. SHEDLARSKI und GILVARG (1970) inaktivierten das Enzym in Anwesenheit von Pyruvat mit Natriumborhydrid und isolierten nach Hydrolyse des Enzyms ϵ -N-1-Carboxyethyllysin. Dieser Versuch zeigte gleichzeitig, daß Pyruvat in Abwesenheit von Aspartat Semialdehyd, dem zweiten Substrat, an das aktive Zentrum der DHDPA-Synthase binden kann.

Während der Fertigstellung dieser Arbeit veröffentlichten KUMPAISAL et al (1987) ihre Ergebnisse über die Reinigung und Charakte-

risierung der DHDPA-Synthase aus Weizen-Zellsuspensionskulturen. Das bis zur Homogenität gereinigte Enzym weist sowohl bezüglich des Molekulargewichts und der Quartärstruktur als auch hinsichtlich des Reaktionsmechanismus der Dihydrodipicolinatsynthese große Ähnlichkeiten mit dem Enzym aus *E. coli* auf. Es besteht gleichfalls aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 33000 Dalton, und die Kondensationsreaktion erfolgt, genau wie bei dem bakteriellen Enzym (III.2.3.1.), über einen Ping-Pong Mechanismus, bei dem Pyruvat als erstes Substrat an das Enzym bindet.

Lysin und S-2-Aminoethylcystein erwiesen sich als Inhibitoren der DHDPA-Synthase (Abb. 14). Die Bedeutung dieses Effekts für die Regulation der Lysinbiosynthese wird weiter unten diskutiert (IV.C.).

In dieser Arbeit wurde weiterhin der Einfluß von insgesamt 11 verschiedenen Pyruvatanaloga auf die Aktivität der DHDPA-Synthase mit dem Ziel untersucht, Strukturmerkmale der Verbindungen, wie räumlicher Aufbau, Ladungsverteilung usw. mit ihrer Fähigkeit zur Hemmung der Enzymaktivität zu korrelieren.

Die Verwendung von Pyruvatanaloga mit unmodifizierter Carboxylgruppe ermöglichte in diesem Zusammenhang, den Einfluß von Veränderungen am C-3 Atom auf die Enzymaktivität zu analysieren. Dabei zeigte sich (Tab. 6), daß der Austausch eines Wasserstoffatoms gegen ein Halogenatom entweder einen vollständigen Verlust der Affinität zum Enzym mit sich brachte (Fluorpyruvat), oder nur in einer geringen Hemmung der Enzymaktivität resultierte (Brompyruvat).

Jede Verlängerung der Kohlenstoffkette des Substratmoleküls führte, unabhängig davon, ob sie durch einen geladenen oder ungeladenen, polaren oder unpolaren Substituenten erfolgte, stets zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Potenz des Moleküls (Tab. 6).

Besonders interessante Ergebnisse erbrachte die Untersuchung von Pyruvatanaloga mit veränderter Carboxylgruppe. Der Einsatz von Organophosphorverbindungen erlaubte es, einfach oder zweifach negativ geladene Inhibitoren zu verwenden und ermöglichte so die Analyse von Ladungseinflüssen auf die Aktivität der DHDPA-Synthase.

Von den fünf untersuchten Pyruvatanaloga mit der allgemeinen Formel $\text{CH}_3\text{-C}(\text{O})\text{-R}$ übte die Verbindung mit der größten Analogie zum Pyruvat, das monoanionische Acetylphosphinat [$\text{R} = \text{PH}(\text{O})\text{OH}$], den stärksten Einfluß auf die Aktivität der DHDPA-Synthase aus (Tab. 6). Der K_i -Wert dieses Inhibitors ist mit 34 μM sogar kleiner

als der K_m -Wert von Pyruvat (0,57 mM), was darauf hinweist, daß dieses Analogon eine höhere Affinität zum Enzym besitzt als das Substrat.

Methylacetylphosphonat [$R = POCH_3(O)OH$] hemmte die DHDPA-Synthase mit einem K_i -Wert von 1,8 mM. Da diese Verbindung eine im Vergleich zum Acetylphosphinat deutlich größere, aber ebenfalls einfach negativ geladene Gruppe besitzt, muß ein sterischer Effekt für die verringerte Affinität zum Enzym verantwortlich gemacht werden. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, daß eine weitere Vergrößerung der funktionellen Gruppe [$R = POC_2H_5(O)OH$] unter Beibehaltung der einfach negativen Ladung einen weiteren Affinitätsverlust zur Folge hat.

Dieser sterische, durch die Größe des Substituenten bedingte Einfluß auf die Affinität eines Inhibitors zur DHDPA-Synthase könnte durch die Bestimmung der inhibitorischen Potenz von Methylacetylphosphinat [$R = PCH_3(O)OH$] bestätigt werden. Diese ebenfalls monoanionische Verbindung, die in dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand, sollte die DHDPA-Synthase stärker als Methylacetylphosphonat, aber weniger stark als Acetylphosphinat hemmen.

Die Einführung einer doppelt negativ geladenen Gruppe [Acetylphosphonat, $R = P(O)(OH)_2$] führte ebenso zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Potenz des Moleküls wie das Vorhandensein einer ungeladenen Gruppe [$R = P(O)(CH_3)$] (Tab. 6).

Aus den hier aufgezeigten Zusammenhängen zwischen der Struktur einer Verbindung und ihrer Fähigkeit zur Hemmung der DHDPA-Synthase ergibt sich eine Reihe von Konsequenzen für die Entwicklung von potentiellen Inhibitoren dieses Enzyms.

Ein mit Pyruvat um die Bindung an das Enzym konkurrierender Inhibitor muß eine einfach negativ geladene Gruppe geringer Größe besitzen. Diese muß einer Ketogruppe benachbart sein, weil die Carbonylfunktion ein essentieller Bestandteil eines potentiellen Inhibitors ist. Der Verzicht auf diese funktionelle Gruppe fällt nämlich zwangsläufig mit dem Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen dem Substratmolekül und dem aktiven Zentrum des Enzyms zusammen. Ohne diese Wechselwirkung kann eine Hemmung der Enzymaktivität aber sicherlich nicht zustandekommen. Zudem darf ein möglicher Inhibitor nicht länger als eine Kohlenstoffkette aus drei C-Atomen sein, ohne seine Hemmwirkung einzubüßen.

Aus diesen Anforderungen resultiert eine starke Einschränkung der Molekülstrukturen potentieller Inhibitoren. Die daraus zwangsweise folgende große Ähnlichkeit von Inhibitor und Substrat bedingt zudem wahrscheinlich eine sehr geringe Selektivität des

Inhibitors. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, daß drei der fünf untersuchten Organophosphorverbindungen, nämlich Methylacetylphosphonat, Acetylphosphonat und Acetylphosphinat, höchst wirksame Hemmstoffe des Pyruvat Dehydrogenase Multienzymkomplexes sind (KLUGER und PIKE, 1977; O'BRIEN et al. 1980; LABER und AMRHEIN, 1987).

Auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann daher zusammenfassend gesagt werden, daß bei der Suche nach Inhibitoren der DHDPA-Synthase die Synthese von Pyruvatanaloga mit größter Wahrscheinlichkeit nicht zum Erfolg führen wird. Ob es bei der Suche nach neuen Inhibitoren aussichtsreicher ist, sich auf Analoga von Aspartat Semialdehyd zu konzentrieren, oder ob man mit der Suche besser bei möglichen allosterischen Effektoren ansetzt, könnten zukünftige Untersuchungen über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zeigen.

In der Literatur besteht keine völlige Klarheit über die Quartärstruktur der Dihydrodipicolinat Reduktase. TAMIR und GILVARG (1974) bestimmten das Molekulargewicht des nativen Enzyms durch Gelfiltration mit 110 kD. Auf Grund der Identifizierung eines 32 kD Polypeptides als Produkt des **dap B** Gens von *E. coli* schlug MACKIE (1980) für die native DHDPA-Reduktase einen Aufbau aus vier identischen Untereinheiten vor, doch mußte nach der Bestimmung der Nucleotidsequenz des **dap B** Gens durch BOUVIER et al (1984) das Molekulargewicht der Untereinheit mit 28798 Dalton deutlich niedriger angesetzt werden.

Um diese Unklarheiten zu beseitigen wurde in dieser Arbeit das Molekulargewicht der DHDPA-Reduktase durch Gelfiltration (natives Enzym) und, erstmals, durch Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Untereinheiten) bestimmt (III.2.4.1.).

Für das native Enzym ergab sich ein Molekulargewicht von 123 kD, ein Wert, der in etwa mit dem Literaturwert von 110 kD (TAMIR und GILVARG, 1974) übereinstimmt. Das Molekulargewicht des denaturierten Enzyms betrug etwa 25,5 kD, in guter Übereinstimmung mit dem aus der Nucleotidsequenz abgeleiteten Wert. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die native DHDPA-Reduktase ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes tetrameres Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 115,2 kD sein muß.

Die aus *C. glutamicum* ATCC 21488 isolierte Diaminopimelat Dehydrogenase besitzt im wesentlichen die gleiche Affinität zu den Substraten meso-DAP und NADP wie die bisher gereinigten und

charakterisierten Enzyme (III.2.5.1.; MISONO und SODA, 1980b; MISONO et al, 1986a und 1986b). Da aus den doppelt reziproken Auftragungen der Initialgeschwindigkeiten der Deaminierungsreaktion gegen die Substratkonzentrationen jeweils eine Geradenschar mit gemeinsamen Schnittpunkt auf der Abszisse resultierte (Abb. 20, Abb. 21), wird im Verlauf der Reaktion ein ternärer Komplex aus Enzym, meso-DAP und NADP gebildet. Im Vergleich mit den bisher untersuchten Enzymen (MISONO und SODA, 1980b; MISONO et al, 1986a) läßt dies den Schluß zu, daß die Bindung von NADP und meso-DAP an das Enzym sequentiell und in der angegebenen Reihenfolge erfolgt. Zur Absicherung dieses Reaktionsmechanismus ist aber auch eine kinetische Analyse des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Untersuchung der Hinreaktion (reduktive Aminierung) erforderlich. Auffällig ist, daß bis heute nur DAP-Dehydrogenasen aus Gram-negativen Bakterien untersucht worden sind. Die Reinigung und Charakterisierung dieses Enzyms aus Gram-positiven Bakterien wäre daher wünschenswert.

Eigenschaften und Vorteile des mit der Saccharopin Dehydrogenase gekoppelten optischen Tests zur Bestimmung der Aktivität der Diaminopimelat Decarboxylase sind bereits ausführlich beschrieben worden (III.2.6.1.).

Im Gegensatz zur Beobachtung von WHITE und KELLY (1965) wurde die DAP-DC durch das schwefelhaltige Diaminopimelat-Analogon Lanthionin kompetitiv gehemmt (III.2.6.2.). Der K_i -Wert von 3,6 mM (Abb. 29) entspricht dabei nahezu dem K_m -Wert für meso-DAP (2,3 mM).

Der Einfluß einer größeren Anzahl von Substratanaloga auf die Aktivität der DAP-DC wurde von GIRODEAU et al (1986) und KELLAND et al (1986) untersucht und wird weiter unten diskutiert (IV.D).

3. Das in vitro-Testsystem

Nach der Nomenklatur von FEDTKE (1982), der Testsysteme zur Beurteilung von Herbizidwirkungen auf Grund der Komplexizität der analysierten Stoffwechselprozesse in drei Gruppen einteilte, muß der Agardiffusionstest zu den superkomplexen Systemen, das **in vivo**-Testsystem, mit dem der Einfluß von Chemikalien auf die Lysinsekretion von *C. glutamicum* gemessen wurde, zu den komplexen Systemen gerechnet werden. Einfacher als diese Systeme, die mit intakten Organismen arbeiten, sind definierte Systeme zu überschauen, da es sich hier um zellfreie Systeme handelt, in denen

der Einfluß von Inhibitoren auf isolierte Enzyme oder Enzymsysteme analysiert wird. In der Literatur finden sich verschiedene Beispiele für die Verwendung definierter Systeme zum Studium von Herbizidwirkungen. Hier soll nur der Einsatz eines zellfreien Extrakts von **Aerobacter aerogenes** 62-1 zur Umwandlung von Shikimat in Chorismat im Zusammenhang mit der Aufklärung des Wirkmechanismus des Herbizides Glyphosat angeführt werden (AMRHEIN et al, 1980).

Die vorliegende Arbeit befaßte sich mit der Entwicklung eines zellfreien (definierten) Systems, mit dem Substanzen, die im **in vivo**-Test als Hemmstoffe der Lysinexkretion identifiziert wurden, bezüglich ihres Wirkmechanismus untersucht werden konnten.

Das einfachste zellfreie System zur Lysinsynthese, das man sich vorstellen kann, besteht aus einem Bakterienrohextrakt, der zusammen mit den erforderlichen Substraten und Kofaktoren inkubiert wird. Aber obwohl in der Literatur Systeme beschrieben sind, in denen Diaminopimelat unter Verwendung von **E. coli**-Rohextrakten aus Aspartat (GILVARG, 1958; FARKAS und GILVARG, 1965; BERGES et al, 1986a) oder unter Verwendung von **Bacillus sphaericus**-Rohextrakten aus Aspartat Semialdehyd und Pyruvat (WHITE, 1983) synthetisiert werden konnte, gelang mit keinem dieser Systeme die Synthese von Lysin.

Eigene Versuche, Lysin in Rohextrakten von **E. coli** oder **C. glutamicum** synthetisieren zu lassen, hatten keinen Erfolg.

Dagegen gelang die enzymatische Synthese von Lysin aus Aspartat, wenn an Stelle eines Bakterienrohextrakts gereinigte Enzyme eingesetzt wurden (III.3.3.).

Um ein möglichst einfaches, mit einer minimalen Zahl von Enzymen arbeitendes System zu entwickeln, wurde die Synthese von Diaminopimelat durch reduktive Aminierung von Tetrahydrodipicolinsäure bewerkstelligt. So wurde für diesen Reaktionsschritt nur ein einziges Enzym, die Diaminopimelat Dehydrogenase, benötigt und nicht, wie bei der Lysinbiosynthese über acylierte Intermediate, vier verschiedene.

Die **in vitro**-Lysinsynthese lief mindestens 7 Stunden lang mit konstanter Geschwindigkeit ab (Abb. 30) und erfolgte bei einem pH-Wert um 8,0 mit maximaler Geschwindigkeit (Abb. 31). Pyridoxalphosphat war ein essentieller Bestandteil des **in vitro**-Systems. Fehlte dieser Kofaktor, wurde nicht Lysin, sondern die unmittelbare Vorstufe meso-DAP gebildet (III.3.3.). Der Nachweis,

daß es sich bei der im ~~ininitiator~~**in vitro** System gebildeten Ninhydrin-positiven Verbindung tatsächlich um L-Lysin handelte, wurde durch Chromatographie des Reaktionsproduktes mit authentischem Lysin, sowohl auf Dünnschichtchromatogrammen (Abb. 32) als auch bei der Aminosäurenanalyse (Abb. 33), und durch enzymatische Umsetzung des Reaktionsproduktes zu Saccharopin (III.3.3.5.) geführt.

Damit gelang es zum ersten Mal, die gesamte Lysinbiosynthese, ausgehend von Aspartat und Pyruvat, **in vitro** erfolgreich zu rekonstituieren.

Trotz der Verwendung eines heterologen, mit Enzymen aus drei verschiedenen Bakterienarten zusammengesetzten Systems wurde kein artefiziell System, sondern eine tatsächlich in der Natur, z.B. bei **Bacillus sphaericus** (WHITE, 1983; BARTLETT und WHITE, 1985), existierende Variante des Diaminopimelinsäureweges rekonstituiert.

Daß die **in vitro**-Rekonstitution ganzer Biosynthesewege eine zum Studium des Einflusses von Antimetaboliten geeignete Methode ist, konnte von SHAMES et al (1984) gezeigt werden. Diese Autoren entwickelten das von SZCZESIUL und WAMPLER (1976) erstellte System weiter, mit dem die Biosynthese von Threonin **in vitro** nachvollzogen wurde, und untersuchten den Stoffdurchsatz durch diesen Biosyntheseweg sowie den Einfluß verschiedener Aspartatanaloga.

Die in dem hier beschriebenen System verwendeten Reaktionsbedingungen und Enzymkonzentrationen waren sicherlich in vielerlei Hinsicht von den physiologischen Bedingungen in der lebenden Zelle entfernt. Dennoch kann das Reaktionssystem als lebensnahe Simulation angesehen werden, weil die relativen Enzymkonzentrationen den in der Zelle vorliegenden Enzymkonzentrationen nahekommen und in diesem System nicht, wie bei der Untersuchung isolierter Enzymreaktionen, niedrige Enzym- und hohe Substratkonzentrationen eingesetzt wurden, sondern, eher den **in vivo** vorliegenden steady-state Bedingungen entsprechende, niedrige Substrat- und hohe Enzymkonzentrationen.

Das hier vorgestellte System ist somit sicherlich geeignet, einen Beitrag zur Analyse der Regulation der Lysinbiosynthese in der lebenden Zelle zu leisten.

Um dies zu demonstrieren, wurde der Einfluß der Aminosäuren L-Lysin und L-Threonin auf die **in vitro**-Lysinsynthese analysiert (III.3.6.). Dabei zeigte sich, daß die durch simultane Einwirkung von Lysin und Threonin verursachte Hemmung der Gesamtreaktion (Tab. 12) und die **in vitro** gemessenen regulatorischen Eigen-

schaften der Aspartat Kinase identisch sind (Tab. 3). Interessanterweise wird die Gesamtreaktion jedoch durch Lysin alleine nur um 13% gehemmt (Tab. 12), obwohl die verwendete Lysinkonzentration ausreichend wäre, um die Aktivität der DHDPA-Synthase um mehr als 75% zu inhibieren (Abb. 14). Damit muß bezweifelt werden, daß die Feedback-Hemmung der DHDPA-Synthase durch Lysin von physiologischer Bedeutung ist, zumal dieser Regulationsmechanismus auf Grund genetischer und stoffwechselphysiologischer Untersuchungen ebenfalls in Frage gestellt worden ist (PATTE, 1983; vgl. III.2.3.). Unklar ist, warum Threonin alleine die Lysinsynthese um 43% verringerte (Tab. 12).

Da das hier beschriebene System einer ganz ähnlichen Regulation unterliegt wie in der lebenden Zelle, ließe es sich sicherlich auch dazu verwenden, um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *in vivo*-Lysinbiosynthese zu bestimmen. Dazu wäre nur die exakte Bestimmung der relativen Aktivitäten der während verschiedener Wachstumsphasen an der Biosynthese von Lysin beteiligten Enzyme erforderlich, um ein genau den Bedingungen in der lebenden Zelle entsprechendes System zusammenzusetzen. Die Kenntnis des die Lysinsynthese limitierenden Reaktionsschrittes wäre z.B. in der Biotechnologie für die Optimierung Lysin-produzierender Bakterien von Interesse, könnte aber auch Herbizidchemikern bei einer gerichteten Synthese von Inhibitoren der Lysinsynthese den geeignetsten Wirkort aufzeigen.

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Testsystems, das den gezielten Nachweis von Inhibitoren der Lysinsynthese ermöglichen sollte.

Daß das hier vorgestellte System dieses zu leisten vermag, ist indirekt schon bei der Analyse des Einflusses der beiden Aminosäuren Lysin und Threonin auf die *in vitro*-Lysinsynthese gezeigt worden. Da beide Aminosäuren zusammen die Aktivität der Aspartat Kinase hemmen (Tab. 3), können sie, mangels spezifischer Inhibitoren für ein Enzym der Lysinbiosynthese, als ein Modell für einen Inhibitor der Lysinsynthese angesehen werden. Erwartungsgemäß kam es im *in vitro*-Test in ihrer Anwesenheit zu einer drastischen Verringerung der Lysinsynthese (Tab. 12), so daß bestätigt werden konnte, daß die Hemmung eines an der Gesamtreaktion beteiligten Enzyms tatsächlich die Gesamtmenge des gebildeten Lysins reduziert.

Die Tatsache, daß Acetylphosphinat, ein Inhibitor der DHDPA-Synthase (Tab. 6, Abb. 16), die *in vitro*-Lysinsynthese zu hemmen vermochte (Tab. 13), muß als weiterer Beweis angesehen werden. Acetylphosphinat inhibierte die Lysinsynthese aber nicht so

stark, wie man es von der Untersuchung des isolierten Enzyms her erwarten könnte (Tab. 6, Tab. 13). Da Acetylphosphinat die DHDPASynthase kompetitiv in Bezug auf Pyruvat hemmt (Abb. 16), muß wahrscheinlich die im **in vitro**-System verwendete höhere Pyruvatkonzentration (20 mM, 5 mM bei der Messung der isolierten Enzymreaktion) für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden.

Bei der Untersuchung von sechs im **in vivo**-Test als wirksam erkannten Verbindungen zeigte sich erwartungsgemäß, daß Substanzen, die im Agardiffusionstest nur auf Hefen wachstumshemmend wirkten, die Lysinsynthese nicht beeinflussten. Aber auch von den gegen Hefen und Bakterien, oder ausschließlich gegen Bakterien, wirksamen Verbindungen zeigte im **in vitro**-Test nur eine einzige eine schwache Wirkung. Daß dies nicht auf der Hemmung eines Enzyms der Lysinsynthese beruhte, konnte durch Untersuchungen an den isolierten Enzymen gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurde somit kein spezifisch in die Lysinsynthese eingreifender Inhibitor gefunden. Dennoch konnte gezeigt werden, daß die vorgestellten Testsysteme prinzipiell geeignet sind, um eine derartige Verbindung zu identifizieren. Allerdings ist dazu mit Sicherheit die Untersuchung einer deutlich größeren Zahl von Verbindungen erforderlich, als in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Ein wesentlicher Vorteil des zellfreien Systems ist in der einfach zu erzielenden hohen Wirkstoffkonzentration am Wirkort zu sehen. Dadurch besteht, im Gegensatz zum **in vivo**-Test, nicht die Gefahr, daß eine potentiell aktive Substanz auf Grund einer limitierten oder fehlenden Aufnahme unentdeckt bleibt. Das bedeutet auf der anderen Seite aber auch, daß eine Substanz, die **in vitro** sehr aktiv ist, **in vivo** wirkungslos sein kann.

Da der **in vitro**-Test die mit Abstand sicherste Beurteilung des Wirkortes einer Verbindung ermöglicht, wäre es unter Umständen sinnvoll, interessante Chemikalien direkt in diesem Test zu untersuchen.

In dieser Hinsicht wären einige Vereinfachungen des Tests wünschenswert.

So könnte z.B. die Bestimmung des gebildeten Lysins durch HPLC-Aminosäurenanalyse sowohl die Verwendung eines radioaktiven Substrats als auch die zeitraubende Trennung der Reaktionsprodukte durch Ionenaustausch- und Dünnschichtchromatographie überflüssig machen. Der Verzicht auf die Dünnschichtchromatographie ist bei der Verwendung des beschriebenen Systems leider nicht mög-

lich, weil bei der Ionenaustauschchromatographie Diaminopimelat und Lysin nicht getrennt werden. Hemmstoffe der Diaminopimelat Decarboxylase würden folglich nicht erkannt werden. Die Notwendigkeit, gereinigte Enzyme zur Rekonstitution der Lysinsynthese verwenden zu müssen, hat den Nachteil, daß sie den relativ hohen Arbeitsaufwand der Reinigung der einzelnen Komponenten des Systems erforderlich macht. Es wäre daher aus Gründen der Zeit- und Arbeitersparnis wünschenswert, die Gesamtreaktion in einem Rohextrakt ablaufen zu lassen. Forschungsanstrengungen in dieser Richtung wären sicherlich nicht aussichtslos, zumal die Arbeiten von GRAEBE (1984 und 1987 und dort zitierte Arbeiten) zeigen, daß selbst ein so komplexer Stoffwechselweg wie die Biosynthese der Gibberelline **in vitro** in pflanzlichen Rohextrakten durchgeführt werden kann. Gelänge die zellfreie Lysinsynthese in Rohextrakten, hätte dies auch den Vorteil, daß ohne allzu-großen Aufwand der Einfluß von potentiellen Inhibitoren auf verschiedene Varianten des Diaminopimelinsäureweges analysiert werden könnte.

Betrachtet man die in dieser Arbeit vorgestellten Testsysteme zusammenfassend, dann repräsentiert der **in vivo**-Test ein System, mit dem ohne großen Arbeits- und Zeitaufwand routinemäßig der Einfluß einer Vielzahl von Chemikalien auf die Lysinexkretion von **C. glutamicum** untersucht werden kann. Aber trotz aller Bemühungen, und trotz der Ergänzung durch den Agardiffusionstest, ist es nicht gelungen, diesen Test so selektiv zu machen, daß ausschließlich Inhibitoren der Lysinsynthese mit ihm erfaßt werden. Da im Gegenteil die Mehrzahl der mit dem **in vivo**-Test gefundenen Verbindungen keine spezifischen Hemmstoffe der Lysinbiosynthese sind, ist es erforderlich, sie auch im **in vitro**-Test auf Wirksamkeit zu prüfen.

Mit dem **in vitro**-Test wurde ein hochspezifisch reagierendes, aber leider auch mit relativ hohem Aufwand verbundenes System vorgestellt, durch das die Identifizierung eines Inhibitors der Lysinbiosynthese mit Sicherheit gelingt. Da aber zur Zeit nicht alle der in der Natur existierenden Varianten des Diaminopimelinsäureweges mit dem **in vitro**-Test nachvollziehbar sind, können Hemmstoffe der an den komplexen Acylierungs-/Deacylierungsreaktionen beteiligten Enzyme und der Diaminopimelat Epimerase noch nicht nachgewiesen werden. Zukünftige Forschungsanstrengungen sollten aber dazu beitragen können, daß diese Einschränkungen überwunden werden.

Wenn dies gelingt und zudem einige bereits angesprochene Vereinfachungen in die Praxis umgesetzt werden, steht insgesamt ein Testsystem bereit, mit dem die Entdeckung spezifischer Inhibito-

ren der Lysinbiosynthese in absehbarer Zeit gelingen sollte.

4. Allgemeine Überlegungen

In etiolierten Buchweizen-Keimlingen kann die Synthese von Anthocyanen, von L-Phenylalanin abgeleitete sekundäre Pflanzenstoffe, sehr einfach durch Bestrahlen mit Weisslicht induziert werden (SCHERF und ZENK, 1967).

Da die Anthocyane **de novo** synthetisiert werden und zudem keinem meßbaren Turnover unterliegen, stellt ihre lichtinduzierte Synthese ein Maß für den Stoffdurchsatz durch den Shikimisäureweg dar.

Wird ein Enzym des Shikimisäureweges oder die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) gehemmt, manifestiert sich dies in einer reduzierten Akkumulation dieser Pigmente. Der Nachweis, daß tatsächlich ein Enzym des Shikimisäureweges oder die PAL Wirkort des Hemmstoffes ist, gelingt sehr leicht durch Fütterungsexperimente, weil in diesem Fall die Wirkung des Inhibitors durch Phenylalanin revertierbar ist.

Da Anthocyane zudem sehr einfach quantifiziert werden können, und in den meisten Fällen sogar eine qualitative visuelle Beurteilung der Pigmentierung der Hypocotyle zur Bestimmung der Inhibitorwirkung ausreicht, repräsentiert die lichtinduzierte Anthocyan-synthese beim Buchweizen ein beinahe optimales Testsystem für die Suche nach neuen Inhibitoren des Shikimisäureweges.

Außerdem vermag dieses System wertvolle Hilfe bei der Aufklärung des Wirkmechanismus von Inhibitoren der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, wie z.B. Glyphosat, zu leisten (zusammenfassende Darstellung bei AMRHEIN, 1986).

Die Einfachheit des oben beschriebenen Systems und seine Brauchbarkeit bei der Suche nach Inhibitoren der Aromatenbiosynthese weckten den Wunsch nach einem ähnlich einfachen System für die Suche nach Inhibitoren der Lysinbiosynthese.

Die beiden wichtigsten Voraussetzung für ein derartiges System sind (a) die Existenz von sekundären Pflanzenstoffen, die vom Lysin abgeleitet werden, und (b) die Notwendigkeit, daß deren Biosynthese durch die Einwirkung eines äußeren Faktors induziert werden kann.

Zu den sekundären Pflanzenstoffen, deren Vorstufe Lysin ist, gehören die Piperidin- und die Chinolizidin-Alkaloide (GOODWIN und MERCER, 1982). Die Biosynthese der besonders bei Fabaceen verbreiteten Chinolizidin-Alkaloide erfolgt durch Kondensation von Cadaverin-Molekülen, die durch Decarboxylierung von L-Lysin gebildet werden (GOODWIN und MERCER, 1982; GOLEBIEWSKI und SPEN-

SER, 1984 und 1985). In Lupinen sind diese Alkaloide in allen Pflanzenteilen nachweisbar, doch schwankt der Alkaloidgehalt der Pflanzen und die Alkaloidzusammensetzung je nach Tageszeit, Jahreszeit und Standortbedingungen (WALLER und NOWACKI, 1978). WINK (1983) konnte durch Verwundung von Blättern von **Lupinus polyphyllus** einen 3- bis 4-fachen Anstieg des Gehaltes an Chinolizidin-Alkaloiden induzieren.

Dieses Ergebnis war die Grundlage für eigene Versuche mit dem Ziel, die durch Verwundung von Lupinen induzierte Alkaloidakkumulation zur Etablierung eines einfachen Testsystems zur Bestimmung des Stoffdurchsatzes durch den Lysinbiosyntheseweg auszunutzen und so für die Lysinbiosynthese ein ähnliches Testsystem zu etablieren, wie es die lichtinduzierte Anthocyansynthese für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren darstellt.

Es gelang aber trotz der Verwendung verschiedenster Pflanzenmaterialien, Anzuchtbedingungen und Verwundungsmethoden nicht, die Ergebnisse von WINK (1983) zu reproduzieren und bei Lupinen durch Verwundung eine signifikante Akkumulation von Chinolizidin-Alkaloiden zu induzieren.

Damit entfiel die zweite wichtige Voraussetzung für ein derartiges Testsystem, nämlich die Induzierbarkeit der Biosynthese eines vom Lysin abgeleiteten sekundären Pflanzenstoffes durch einen äußeren Faktor. In dieser Arbeit wurden aus diesem Grund keine weiteren Versuche in dieser Richtung durchgeführt. Die Suche nach ähnlichen Testsystemen dürfte aber auch in Zukunft interessant sein.

Die Suche nach neuen Herbiziden erfolgt im allgemeinen ungerichtet durch Screening vorhandener und neusynthetisierter Substanzen in verschiedensten Testsystemen.

Eine völlig andere Ansatzweise bei der Suche nach neuen Herbiziden, aber in Zukunft sicherlich mit wachsender Bedeutung für die Herbizidforschung, ist die gerichtete Synthese von Molekülen, die relativ spezifisch in bestimmte metabolische Prozesse eingreifen sollen (herbicide design).

Für diese zweite Vorgehensweise ist eine vertiefte Kenntnis der molekularen Struktur des Enzyms erforderlich, gegen das der potentielle Inhibitor gerichtet sein soll.

In den letzten Jahren sind mit Ausnahme der Gene für die N-Succinyl-Diaminopimelat-Aminotransferase und -Desuccinylase alle Gene der in **E. coli** an der Lysinbiosynthese beteiligten Enzyme, sowie das Gen für die Diaminopimelat Dehydrogenase aus **C. glutamicum**, cloniert worden (BOUVIER et al, 1984; CASSAN et al, 1986; COHEN et al, 1985; HAZIZA et al, 1982; ISHINO et al, 1987; RICHAUD et

al, 1984; RICHAUD et al, 1986; RICHAUD et al, 1987; STRAGIER et al, 1983). Damit sind die Voraussetzungen geschaffen worden, um größere Mengen der von diesen Genen codierten Enzyme für detaillierte proteinchemische und strukturelle Untersuchungen bereitzustellen. Denn erst der Einsatz modernster physikalisch-biochemischer Methoden kann den Herbizid-Chemikern durch die Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen der Enzyme und durch die Identifizierung ihrer aktiven Zentren diejenigen Informationen liefern, die für die gezielte Synthese neuer Inhibitoren erforderlich sind.

Erste Ansätze für die gerichtete Synthese von Hemmstoffen gegen Enzyme der Lysinsynthese sind die Arbeiten von GIRODEAU et al (1986) und von KELLAND et al (1986). Diese Autoren synthetisierten bei der Suche nach neuen Antibiotika Analoga der Diaminopimelinsäure als potentielle Inhibitoren der Diaminopimelat Decarboxylase. Von den 14 verschiedenen Analoga erwiesen sich die Didehydro- und α -Difluormethyl-Derivate der Diaminopimelinsäure, im Gegensatz zu vielen anderen Didehydro- und α -Halomethyl-Aminosäuren (zusammenfassende Darstellung bei WALSH, 1977 und 1984), nicht als irreversible Inhibitoren der Diaminopimelat Decarboxylase. Das Enzym wurde aber durch N-Hydroxy- und N-Amino-Diaminopimelat kompetitiv gehemmt (KELLAND et al, 1986). Auch trans-3,4-Didehydro-pimelat hemmte die Diaminopimelat Decarboxylase, 4-Methylendiaminopimelat jedoch, die Verindung mit der stärksten antibakteriellen Aktivität, besaß keine inhibitorische Aktivität gegenüber dem Enzym (GIRODEAU et al, 1986).

In diesem Zusammenhang sind auch die Arbeiten von BERGES et al (1986a und 1986b) von Interesse. BERGES et al (1986a) synthetisierten Oligopeptide mit antibakterieller Aktivität aus 2-Aminopimelinsäure und verschiedenen proteinogenen Aminosäuren. Diese Peptide werden in die Bakterienzelle eintransportiert, dort wahrscheinlich durch Peptidasen gespalten und 2-Aminopimelinsäure wird im Cytoplasma freigesetzt.

L-2-Aminopimelinsäure, ein acyclisches Analogon der Tetrahydrodipicolinsäure, ist ein alternatives Substrat für die Tetrahydrodipicolinat Succinylase (Succinyl-CoA: Tetrahydrodipicolinat N-Succinyltransferase), das effektiv die Succinylierung von THDPA verhindert. Dadurch wird die Synthese der Zellwandbestandteile Diaminopimelat und Lysin unterbunden, und das Wachstum der Bakterien wird gehemmt.

BERGES et al (1986b) untersuchten auch die Substratspezifität der Tetrahydrodipicolinat Succinylase und zeigten, daß 2-Hydroxytetrahydropyran-2,6-dicarbonsäure ein hochwirksamer kompetitiver Inhibitor des Enzyms ist, der auf Grund seiner hohen Affinität

zum Enzym als transition-state-Analogen angesehen werden kann.

Die Ergebnisse der Arbeiten von BERGES et al (1986a und 1986b) werfen natürlich die Frage auf, ob die beschriebenen Verbindungen auch als Herbizide eingesetzt werden können.

Die Beantwortung dieser Frage wird dadurch erschwert, daß die biochemischen Grundlagen der Lysinbiosynthese in Höheren Pflanzen nur sehr lückenhaft untersucht und verstanden sind. Von besonderem Interesse wären Untersuchungen, die das Ziel haben, zu klären, ob die Lysinsynthese über acylierte Zwischenprodukte, direkt durch reduktive Aminierung, oder durch eine Kombination beider Reaktionssequenzen erfolgt. Denn an Hand der bisher vorliegenden Ergebnisse über den Nachweis der Diaminopimelat Epimerase in einem Extrakt aus Maisblättern (TYAGI et al, 1982) und der Diaminopimelat Dehydrogenase in Sojabohnen und Maisendosperm (WENKO et al, 1985) kann diese Frage nicht beantwortet werden.

Eine verstärkte Untersuchung der biochemischen Grundlagen der Lysinbiosynthese in Höheren Pflanzen, und dies gilt auch für viele andere pflanzliche Stoffwechselprozesse, würde zu einem besseren Verständnis des pflanzlichen Metabolismus führen. Diese Art von Grundlagenforschung könnte letztlich mit Sicherheit auch wertvolle Hilfe bei der Suche nach neuen Herbiziden mit größerer Selektivität und geringerer Toxizität leisten.

V. Zusammenfassung

- 1) **Corynebacterium glutamicum** ATCC 21488 scheidet L-Lysin in das Kulturmedium aus. Die Menge des ausgeschiedenen L-Lysins ist ein Maß für den Stoffdurchsatz durch den Lysinbiosyntheseweg.

Durch die Wahl geeigneter Bedingungen gelang es, die Synthese und Exkretion von L-Lysin vom Zellwachstum und von der Zellvermehrung unabhängig zu machen.

Diese Voraussetzungen ermöglichten die Entwicklung eines Testsystems, das potentielle Inhibitoren der Lysinbiosynthese auf Grund ihrer Fähigkeit identifiziert, die von nichtwachsenden Zellen von **C. glutamicum** ausgeschiedene Lysinmenge zu reduzieren (**in vivo**-Test).

Die Existenz von zwei völlig unterschiedlichen Wegen für die Biosynthese von L-Lysin (Diaminopimelinsäureweg bzw. α -Amino-adipinsäureweg) erlaubte, den Wirkort von Substanzen, die sich im **in vivo**-Test als wirksam erwiesen hatten, mittels eines Agardiffusionstests einzugrenzen.

- 2) Aspartat Kinase aus **Pseudomonas fluorescens**. Diaminopimelat Dehydrogenase aus **Corynebacterium glutamicum**. Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase, Dihydrodipicolinat Synthase, Dihydrodipicolinat Reduktase und Diaminopimelat Decarboxylase aus **Escherichia coli** wurden, mindestens partiell, gereinigt, und ihre kinetischen und regulatorischen Eigenschaften wurden analysiert.

Die Dihydrodipicolinat Synthase katalysiert die Kondensation von Aspartat- β -Semialdehyd und Pyruvat nach einem Ping-Pong Mechanismus, bei dem Pyruvat als erstes Substrat an das Enzym bindet.

Pyruvatanaloga hemmen die Kondensationsreaktion folgendermaßen:

- (a) Analoga mit einer Kohlenstoffkette aus vier oder mehr C-Atomen haben, unabhängig von der Art des Substituenten, keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.
- (b) Einfach negativ geladene Analoga hemmen die Kondensationsreaktion. Die inhibitorische Potenz der Verbindungen nimmt mit steigender Größe des Substituenten ab.
- (c) Doppelt negativ geladene und ungeladene Analoga hemmen die Enzymaktivität nicht.

Die Bestimmung der Molekulargewichte der nativen Dihydrodipicolinat Reduktase und ihrer Untereinheiten zeigte, daß das Enzym aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist.

Für die Messung der Diaminopimelat Decarboxylase wurde ein neuer spektrophotometrischer Test entwickelt, bei dem die Aktivitätsbestimmung durch Messung des NADH-Verbrauchs beim Saccharopin Dehydrogenase-katalysierten Umsatz des Decarboxylierungsproduktes L-Lysin zu Saccharopin erfolgt.

- 3) Aspartat Kinase, Aspartat Semialdehyd Dehydrogenase, Dihydrodipicolinat Synthase, Dihydrodipicolinat Reduktase, Diaminopimelat Dehydrogenase und Diaminopimelat Decarboxylase wurden nach der Reinigung **in vitro** so rekombiniert, daß ihre relativen Aktivitäten den **in vivo** gefundenen Verhältnissen nahe kamen.

Inkubation dieses Systems mit L-(^{14}C)-Aspartat, Pyruvat, ATP, NADPH, Pyridoxalphosphat und NH_4^+ führte zur Bildung von ^{14}C -Lysin, das aus dem Reaktionsansatz isoliert und anschließend quantifiziert wurde.

Der Nachweis, daß es sich bei dem Produkt der Reaktion um L-Lysin handelt, erfolgte durch Vergleich mit der authentischen Verbindung

Damit gelang erstmals **in vitro** die Rekonstitution der gesamten Lysinbiosynthese.

Untersuchungen der regulatorischen Eigenschaften ergaben, daß die gleichen Effektoren, die in der lebenden Zelle die Lysin-synthese regulieren, auch den Fluß von Aspartat durch die Enzyme des **in vitro**-Systems kontrollieren.

Die Messung der Lysinsynthese in Anwesenheit von Inhibitoren verschiedener Teilreaktionen bewies, daß dieses Systems prinzipiell zum gezielten Nachweis von Inhibitoren der Lysinsynthese geeignet ist (**in vitro**-Test).

- 4) Mehrere Substanzen, die sich im **in vivo**-Test als Inhibitoren der Lysinexkretion erwiesen hatten, wurden im **in vitro**-Test beispielhaft bezüglich ihrer Spezifität untersucht.

Spezifische Hemmstoffe der Lysinbiosynthese wurden auf Grund der geringen Zahl der untersuchten Verbindungen nicht gefunden.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die sukzessive Anwendung von **in vivo**- und **in vitro**-Test im Prinzip eine zum gezielten Auffinden von Hemmstoffen der Lysinbiosynthese geeignete Methode ist.

VI. Literaturverzeichnis

AMRHEIN, N.:

Specific inhibitors as probes into the biosynthesis and metabolism of aromatic amino acids

Rec. Adv. Phytochem. **20**, 83 - 117 (1986)

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GHERKE, P.; STEINRÜCKEN, H.C.:

The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation **in vivo** and **in vitro**

Plant Physiol. **66**, 830 - 834 (1980)

ASADA, Y.; TANIZAWA, K.; KAWABATA, Y.; MISONO, H.; Soda, K.:

Purification and properties of meso- α,ϵ -diaminopimelate decarboxylase from **Bacillus sphaericus**

Agric. Biol. Chem. **45**, 1513 - 1514 (1981a)

ASADA, Y.; TANIZAWA, K.; SAWADA, S.; SUZUKI, T.; MISONO, H.; SODA, K.:

Stereochemistry of meso- α,ϵ -diaminopimelate decarboxylase reaction: The first evidence for pyridoxal 5'-phosphate dependent decarboxylation with inversion of configuration
Biochemistry **20**, 6881 - 6886 (1981b)

BARTLETT, A.T.M.; WHITE, P.J.:

Species of **Bacillus** that make a vegetative peptidoglycan containing lysine lack diaminopimelate epimerase but have diaminopimelate dehydrogenase

J. Gen. Microbiol. **131**, 2145 - 2152 (1985)

BERGES, D.A.; DEWOLF, W.E.; DUNN, G.L.; GRAPPEL, S.F.; NEWMAN, D.J.; TAGGART, J.J.; GILVARG, C.:

Peptides of 2-aminopimelic acid: Antibacterial agents that inhibit diaminopimelic acid biosynthesis

J. Med. Chem. **29**, 89 - 95 (1986a)

BERGES, D.A.; DEWOLF, W.E.; DUNN, G.L.; NEWMAN, D.J.; SCHMIDT, S.J.; TAGGART, J.J.; GILVARG, C.:

Studies on the active site of succinyl-CoA: tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase. Characterization using analogs of tetrahydrodipicolinate

J. Biol. Chem. **261**, 6160 - 6167 (1986b)

BHATTACHARJEE, J.K.:

Lysine biosynthesis in eukaryotes. In: Amino acids:

Biosynthesis and genetic regulation (HERRMANN, K.M.;

SOMERVILLE, R.L., eds.), 229 - 244, Adison-Wesley Publishing Company (1983)

- BHATTACHARJEE, J.K.:
Alpha-aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes
CRC Crit. Rev. Microbiol. **12**, 131 - 151 (1985)
- BIELLMANN, J.F.; EID, P.; HIRTH, C.; JOERNVALL, H.:
Aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*.
Purification and general properties
Eur. J. Biochem. **104**, 53 - 58 (1980a)
- BIELLMANN, J.F.; EID, P.; HIRTH, C.; JOERNVALL, H.:
Aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*.
Affinity labeling with the substrate analogue L-2-amino-4-oxo-5-chloropentanoic acid: an example of half-site reactivity
Eur. J. Biochem. **104**, 59 - 64 (1980b)
- BIELLMANN, J.F.; EID, P.; HIRTH, C.; JOERNVALL, H.:
Affinity labeling of the *Escherichia coli* aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase with an alkylating coenzyme analogue.
Half-site reactivity and competition with the substrate alkylating analogue
Eur. J. Biochem. **104**, 65 - 69 (1980c)
- BISSWANGER, H.:
Theorie und Methoden der Enzymkinetik
Verlag Chemie (1979)
- BLACK, S.; WRIGHT, N.G.:
Aspartic- β -semialdehyde dehydrogenase and aspartic- β -semi-aldehyde
J. Biol. Chem. **213**, 39 - 50 (1955a)
- BLACK, S.; WRIGHT, N.G.:
Homoserine dehydrogenase
J. Biol. Chem. **213**, 51 - 60 (1955b)
- BLANCH, H.W.; DREW, S.; WANG, D.J.C.:
The practice of biotechnology: Current commodity products.
Comprehensive biotechnology (MOO-YOUNG, M., ed.), Vol. 3, 593 - 651, Pergamon Press (1985)
- BOTHWELL, M.A.; DATTA, P.:
Effects of K^+ on the catalytic and regulatory properties of homoserine dehydrogenase of *Pseudomonas fluorescens*
Biochim. Biophys. Acta **235**, 1 - 13 (1971)
- BOUVIER, J.; RICHAUD, C.; RICHAUD, F.; PATTE, J.C.; STRAGIER, P.:
Nucleotide sequence and expression of the *Escherichia coli* **dap B** gene
J. Biol. Chem. **259**, 14829 - 14834 (1984)

BRADFORD, M.M.:

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. **72**, 248 - 254 (1976)

BRYAN, J.K.:

Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In: The Biochemistry of Plants (P.K. STUMPF, E.E. CONN, eds.), Vol. 5, 403 - 452, Academic Press (1980)

CARDINEAU, G.A.; CURTISS, R.:

Nucleotide sequence of the **asd** gene of *Streptococcus mutans*. Identification of the promoter region and evidence for attenuator-like sequences preceding the structural gene
J. Biol. Chem. **262**, 3344 - 3353 (1987)

CASSAN, M.; PARSOT, C.; COHEN, G.N.; PATTE, J.C.:

Nucleotide sequence of **lys C** gene encoding the lysine-sensitive aspartokinase III of *Escherichia coli* K12
J. Biol. Chem. **261**, 1052 - 1057 (1986)

CHATTERJEE, S.P.; WHITE, P.J.:

Activities and regulation of the enzymes of lysine biosynthesis in a lysine excreting strain of *Bacillus megaterium*
J. Gen. Microbiol. **128**, 1073 - 1081 (1982)

COHEN, G.N.:

The common pathway to lysine, methionine, and threonine. In: Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation (HERRMANN, K.M.; SOMERVILLE, R.L., eds.) 147 - 171, Addison-Wesley Publishing Company (1983)

COHEN, G.N.; STANIER, R.Y.; LEBRAS, G.:

Regulation of the biosynthesis of amino acids of the aspartate family in coliform bacteria and pseudomonads
J. Bacteriol. **99**, 781 - 801 (1969)

COHEN, G.N.; VERON, M.; ZAKIN, M.M.:

Recent biochemical and genetic studies on the amino acid biosynthetic pathway of the aspartate family in *Escherichia coli*. In: Current topics in cellular regulation. Vol. 26: Modulation by molecular interactions (LEVINE, R.L.; GINSBURG, A., eds.), 447 - 454, Academic Press (1985)

CUATRECASAS, P.:

Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads
J. Biol. Chem. **245**, 3059 - 3065 (1970)

- DAUCE, L.B.; BOITEL, M.; DESCHAMPS, A.M.; LEBEAULT, J.M.; SANO, K.; TAKINAMI, K.; PATTE, J.C.:
Improvement of **Escherichia coli** strains overproducing lysine using recombinant DNA techniques
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **15**, 227 - 231 (1982)
- DAVIS, B.D.; MINGIOLI, E.S.:
Mutants of **Escherichia coli** requiring methionine or vitamin B₁₂
J. Bacteriol. **60**, 17 - 28 (1950)
- DEWEY, D.L.; HOARE, D.S.; WORK, E.:
Diaminopimelic acid decarboxylase in cells and extracts of **Escherichia coli** and **Aerobacter aerogenes**
Biochem. J. **58**, 523 - 531 (1954)
- DIFCO Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures, 9th edition, Difco Laboratories Inc., Detroit (1972)
- DUNGAN, S.M.; DATTA, P.:
Concerted feedback inhibition. Purification and some properties of aspartokinase from **Pseudomonas fluorescens**
J. Biol. Chem. **248**, 8534 - 8540 (1973a)
- DUNGAN, S.M.; DATTA, P.:
Modifier-induced oligomerization of the **Pseudomonas fluorescens** aspartokinase
J. Biol. Chem. **248**, 8541 - 8546 (1973b)
- FARKAS, W.; GILVARG, C.:
The reduction step in diaminopimelic acid biosynthesis
J. Biol. Chem. **240**, 4717 - 4722 (1965)
- FEDTKE, C.:
Biochemistry and physiology of herbicide action
Springer Verlag (1982)
- FUJIOKA, M.; NAKATANI, Y.:
A kinetic study of saccharopine dehydrogenase reaction
Eur. J. Biochem. **16**, 180 - 186 (1970)
- GILVARG, C.:
The enzymatic synthesis of diaminopimelic acid
J. Biol. Chem. **233**, 1501 - 1504 (1958)
- GIRODEAU, J.M.; AGOURIDAS, C.; MASSOU, M.; PINEAU, R.; LE GOFFIC, F.:
The lysine pathway as a target for a new genera of synthetic antibiotics?
J. Med. Chem. **29**, 1023 - 1030 (1986)

- GOLEBIEWSKI, W.M.; SPENSER, I.D.:
²H NMR spectroscopy as a probe of the stereochemistry of biosynthetic reactions: The biosynthesis of lupanine and sparteine
 J. Amer. Chem. Soc. **106**, 7925 - 7927 (1984)
- GOLEBIEWSKI, W.M.; SPENSER, I.D.:
 Biosynthesis of the lupine alkaloids. I. Lupanine
 Can. J. Chem. **63**, 2707 - 2718 (1985)
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I.:
 Introduction to plant biochemistry
 Pergamon Press (1982)
- GRAEBE, J.E.:
 Die Gibberellinbiosynthese in zellfreien Systemen aus unreifen Kürbis- und Erbsensamen
 Berichte Deutsch. Bot. Ges. **97**, 67 - 74 (1984)
- GRAEBE, J.E.:
 Gibberellin biosynthesis and control
 Ann. Rev. Plant Physiol. **38**, 419 - 465 (1987)
- HALLING, S.M.; STAHLY, D.P.:
 Dihydropicolinic acid synthase of *Bacillus licheniformis*. Quaternary structure, kinetics, and stability in the presence of sodium chloride and substrates
 Biochim. Biophys. Acta **452**, 580 - 596 (1976)
- HAZIZA, C.; STRAGIER, P.; PATTE, J.C.:
 Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*: absence of a typical attenuation signal
 EMBO Journal **1**, 379 - 384 (1982)
- HEGEMAN, G.D.; COHEN, G.N.; MORGAN, R.:
 Aspartic semialdehyde dehydrogenase (*Escherichia coli* K12)
 Methods Enzymol. **17A**, 708 - 713 (1970)
- HERRMANN, K.M.; SOMERVILLE, R.L.:
 Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation
 Addison-Wesley Publishing Company (1983)
- HIROSE, Y.; ENEI, H.; SHIBAI, H.:
 L-Glutamic acid fermentation. In: Comprehensive biotechnology (MOO-YOUNG, M., ed.), Vol. 3: The practice of biotechnology: Current commodity products. (BLANCH, H.W.; DREW, S.; WANG, D.J.C., eds.), 593 - 600, Pergamon Press (1985)
- HOCKING, J.D.; HARRIS, J.I.:
 Purification by affinity chromatography of thermostable glyceraldehyde 3'-phosphate dehydrogenase from *Thermus aquaticus*
 FEBS Lett. **34**, 280 - 284 (1972)

- HOGANSON, D.A.; STAHL, D.P.:
Regulation of dihydrodipicolinate synthase during growth and sporulation of **Bacillus cereus**
J. Bacteriol. **124**, 1344 - 1350 (1975)
- IKEDA, S.; FUKUI, S.:
Preparation of pyridoxal 5'-phosphate-bound sepharose and its use for immobilization of tryptophanase
Biochem. Biophys. Res. Commun. **52**, 482 - 488 (1973)
- ISHINO, S.; MIZUKAMI, T.; YAMAGUCHI, K.; KATSUMATA, R.; ARAKI, K.:
Nucleotide sequence of the meso-diaminopimelate D-dehydrogenase gene from **Corynebacterium glutamicum**
Nucl. Acids Res. **15**, 3917 (1987)
- JOUANNEAU, J.; STRAGIER, P.; BOUVIER, J.; PATTE, J.C.; YANIV, M.:
Expression in mammalian cells of the diaminopimelic acid decarboxylase of **Escherichia coli** permits cell growth in lysine-free medium
Eur. J. Biochem. **146**, 173 - 178 (1985)
- KELLAND, J.G.; PALCIC, M.M.; PICKARD, M.A.; VEDERAS, J.C.:
Stereochemistry of lysine formation by meso-diaminopimelate decarboxylase from wheat germ: Use of ^1H - ^{13}C NMR shift correlation to detect stereospecific deuterium labeling
Biochemistry **24**, 3263 - 3267 (1985)
- KELLAND, J.G.; ARNOLD, L.D.; PALCIC, M.M.; PICKARD, M.A.; VEDERAS, J.C.:
Analogues of diaminopimelic acid as inhibitors of meso-diaminopimelate decarboxylase from **Bacillus sphaericus** and wheat germ
J. Biol. Chem. **261**, 13216 - 13223 (1986)
- KIMURA, K.:
Pyridine-2,6-dicarboxylic acid (dipicolinic acid) formation in **Bacillus subtilis**. I. Non-enzymatic formation of dipicolinic acid from pyruvate and aspartic semialdehyde
J. Biochem. **75**, 961 - 967 (1974)
- KIMURA, K.:
New flavine enzyme catalyzing the reduction of dihydrodipicolinate in sporulating **Bacillus subtilis**. I. Purification and properties
J. Biochem. **77**, 405 - 413 (1975)
- KIMURA, K.; GOTO, T.:
Dihydrodipicolinate reductase from **Bacillus cereus** and **Bacillus megaterium**
J. Biochem. **81**, 1367 - 1373 (1977)

- KINDLER, S.H.; GILVARG, C.:
N-Succinyl- α,ϵ -diaminopimelic acid deacylase
J. Biol. Chem. **235**, 3532 - 3535 (1960)
- KLUGER, R.; PIKE, D.C.:
Active site generated analogues of reactive intermediates in enzymatic reactions. Potent inhibition of pyruvate dehydrogenase by a phosphonate analogue of pyruvate
J. Amer. Chem. Soc. **99**, 4504 - 4506 (1977)
- KUMPAISAL, R.; HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y.:
Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from wheat suspension cultures
Plant Physiol. **85**, 141 - 151 (1987)
- LABER, B.; AMRHEIN, N.:
Metabolism of 1-aminoethylphosphinate generates acetylphosphinate, a potent inhibitor of pyruvate dehydrogenase
Biochem. J. **248**, 351 - 358 (1987)
- LAEMMLI, U.K.:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4
Nature **227**, 680 - 685 (1970)
- LAKSHMAN, M.; SHENOY, B.C.; RAO, M.R.R.:
Purification and properties of diaminopimelate decarboxylase of *Micrococcus glutamicus*
J. Biosci. **3**, 89 - 103 (1981)
- LARSON, R.L.; SANDINE, W.D.; BROQUIST, H.P.:
Enzymatic reduction of α -aminoadipic acid: Relation to lysine biosynthesis
J. Biol. Chem. **238**, 275 - 282 (1963)
- LEVITT, G.; PLOEG, H.L.; WEIGEL, R.C.; FITZGERALD, D.J.:
2-Chloro-N((4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino-carbonyl)-benzenesulfonamide, a new herbicide
J. Agric. Food Chem. **29**, 416 - 424 (1981)
- MACKIE, G.A.:
Cloning of fragments of λ dap B2 DNA and identification of the **dap B** gene product
J. Biol. Chem. **255**, 8928 - 8935 (1980)
- MATTHEWS, B.F.; WIDHOLM, J.M.:
Regulation of lysine and threonine synthesis in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots
Planta **141**, 315 - 321 (1978)

- MAZELIS, M.; CREVELING, R.K.:
The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants.
Diaminopimelate decarboxylase from wheat germ
J. Food Biochem. **2**, 29 - 37 (1978)
- MAZELIS, M.; MIFFLIN, B.J.; PRATT, H.M.:
A chloroplast-localized diaminopimelate decarboxylase in
higher plants
FEBS Lett. **64**, 197 - 200 (1976)
- MAZELIS, M.; WHATLEY, F.R.; WHATLEY, J.:
The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. The
occurrence, characterization and some regulatory properties of
dihydrodipicolinate synthase
FEBS Lett. **84**, 236 - 240 (1977)
- MILLS, W.R.; LEA, P.J.; MIFFLIN, B.J.:
Photosynthetic formation of the aspartate family of amino
acids in isolated chloroplasts
Plant Physiol. **65**, 1166 - 1172 (1980)
- MISONO, H.; OGASAWARA, M.; NAGASAKI, S.:
Characterization of meso-diaminopimelate dehydrogenase from
Corynebacterium glutamicum and its distribution in bacteria
Agric. Biol. Chem. **50**, 2729 - 2734 (1986a)
- MISONO, H.; OGASAWARA, M.; NAGASAKI, S.:
Purification and properties of meso-diaminopimelate
dehydrogenase from **Brevibacterium sp.**
Agric. Biol. Chem. **50**, 1329 - 1330 (1986b)
- MISONO, H.; SODA, K.:
Determination of meso- α,ϵ -diaminopimelate with meso- α,ϵ -di-
aminopimelate D-dehydrogenase
Agric. Biol. Chem. **44**, 2125 - 2128 (1980a)
- MISONO, K.; SODA, K.:
Properties of meso- α,ϵ -diaminopimelate D-dehydrogenase from
Bacillus sphaericus
J. Biol. Chem. **255**, 10599 - 10605 (1980b)
- MISONO, H.; TOGAWA, H.; YAMAMOTO, T.; SODA, K.:
Occurrence of meso- α,ϵ -diaminopimelate dehydrogenase in
Bacillus sphaericus
Biochem. Biophys. Res. Commun. **72**, 89 - 93 (1976)
- MISONO, H.; TOGAWA, H.; YAMAMOTO, T.; SODA, K.:
Meso- α,ϵ -diaminopimelate dehydrogenase: Distribution and the
reaction product
J. Bacteriol. **137**, 22 - 27 (1979)

- NAKATANI, Y.; FUJIOKA, M.; HIGASHINO, K.:
Enzymic determination of L-lysine in biological materials
Anal. Biochem. **49**, 225 - 231 (1972)
- NAKAYAMA, K.:
Lysine. In: Comprehensive biotechnology (MOO-YOUNG, M., ed.),
Vol. 3: The practice of biotechnology: Current commodity
products. (BLANCH, H.W.; DREW, S.; WANG, D.J.C., eds.),
607 - 620, Pergamon Press (1985)
- NAKAYAMA, K.; KASE, H.:
Simultaneous biosynthesis of L-lysine and L-threonine
Ger. Offen. 2102799 (1971)
- NEGRUTIU, I.; CATTOIR-REYNEARTS, A.; VERBRUGGEN, I.; JACOBS, M.:
Lysine overproducer mutants with an altered dihydro-
dipicolinate synthase from protoplast culture of *Nicotiana
glauca* (Spegazzini and Comes)
Theor. Appl. Genet. **68**, 11 - 20 (1984)
- NORTON, S.J.; CHEN, Y.T.:
Diaminopimelate decarboxylase from *Lactobacillus arabinosus*
Biochim. Biophys. Acta **198**, 610 - 612 (1970)
- O'BRIEN, T.A.; KLUGER, R.; PIKE, D.C.:
Phosphonate analogues of pyruvate. Probes of substrate
binding to pyruvate oxidase and other thiamin pyrophosphate-
dependent decarboxylases
Biochim. Biophys. Acta **613**, 10 - 17 (1980)
- OGAWA, H.; FUJIOKA, M.:
Purification and characterization of saccharopine
dehydrogenase from baker's yeast
J. Biol. Chem. **253**, 3666 - 3670 (1978)
- PATTE, J.C.:
Diaminopimelate and lysine. In: Amino acids: Biosynthesis and
genetic regulation (HERRMANN, K.M.; SOMERVILLE, R.L., eds.)
213 - 228, Addison-Wesley Publishing Company (1983)
- PATTE, J.C.; BOY, E.; BORNE, F.:
Role of the lysine-sensitive aspartokinase III in the regul-
ation of DAP-decarboxylase synthesis in *Escherichia coli* K12
FEBS Lett. **43**, 66 - 70 (1974)
- PAULUS, H.:
Regulation and structure of aspartokinase in the genus
Bacillus
J. Biosci. **6**, 403 - 418 (1984)

- RICHAUD, C.; HIGGINS, W.; MEUGIN-LECREULX, D.; STRAGIER, P.:
Molecular cloning, characterization, and chromosomal location
of **dap F**, the *Escherichia coli* gene for diaminopimelate
epimerase
J. Bacteriol. **169**, 1454 - 1459 (1987)
- RICHAUD, C.; RICHAUD, F.; MARTIN, C.; HAZIZA, C.; PATTE, J.C.:
Regulation of expression and nucleotide sequence of the
Escherichia coli dap D gene
J. Biol. Chem. **259**, 14824 - 14828 (1984)
- RICHAUD, F.; RICHAUD, C.; RATET, P.; PATTE, J.C.:
Chromosomal location and nucleotide sequence of the
Escherichia coli dap A gene
J. Bacteriol. **166**, 297 - 300 (1986)
- RAY, T.B.:
Sulfonylurea herbicides as inhibitors of amino acid
biosynthesis in plants
TIBS **11**, 180 - 183 (1986)
- ROSEN, H.:
A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids
Arch. Biochem. Biophys. **67**, 10 - 15 (1957)
- ROSNER, A.:
Control of lysine biosynthesis in *Bacillus subtilis*:
Inhibition of diaminopimelate decarboxylase by lysine
J. Bacteriol. **121**, 20 - 28 (1975)
- RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B.B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J.T.:
Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water
J. Agric. Food Chem. **25**, 517 - 528 (1977)
- SASAKA, K.; INAGAKI, H.:
Occurrence of aspartic β -semialdehyde dehydrogenase in pea
seedlings
Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ., **21**, 12 - 16 (1960)
- SAUNDERS, P.P.; BROQUIST, H.P.:
Saccharopine, an intermediate of the amino adipic acid pathway
of lysine biosynthesis. IV. Saccharopine dehydrogenase
J. Biol. Chem. **241**, 3435 - 3440 (1966)
- SCHERF, H.; ZENK, M.H.:
Der Einfluß des Lichtes auf die Flavonoidsynthese und die
Enzyminduktion bei *Fagopyrum esculentum* Moench
Z. Pflanzenphysiol. **57**, 401 - 418 (1967)

- SHAMES, S.L.; ASH, D.E.; WEDLER, F.C.; VILLAFRANCA, J.J.:
Interaction of aspartate and aspartate-derived antimetabolites with the enzymes of the threonine biosynthetic pathway of **Escherichia coli**
J. Biol. Chem. **259**, 15331 - 15339 (1984)
- SHANER, D.L.; ANDERSON, P.C.; STIDHAM, M.:
Imidazolinones. Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase
Plant. Physiol. **76**, 545 - 546 (1984)
- SHEDLARSKI, J.G.; GILVARG, C.:
The pyruvate-aspartic semialdehyde condensing enzyme of **Escherichia coli**
J. Biol. Chem. **245**, 1362 - 1373 (1970)
- SHIMURA, Y.; VOGEL, H.J.:
Diaminopimelate decarboxylase of **Lemna perpusilla**: Partial purification and some properties
Biochim. Biophys. Acta **118**, 396 - 404 (1966)
- SIMMS, S.A.; VOIGES, W.H.; GILVARG, C.:
Purification and characterization of succinyl-CoA:tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase from **Escherichia coli**
J. Biol. Chem. **259**, 2734 - 2741 (1984)
- SODA, K.; HIRASAWA, T.; FUKUMURA, T.:
Spectrophotometric determination of L-lysine with L-lysine: α -ketoglutarate ϵ -aminotransferase
Anal. Biochem. **87**, 283 - 286 (1978)
- SODA, K.; TANAKA, H.; ESAKI, N.:
Amino acids. In: Biotechnology (REHM, H.J.; REED, G., eds.), Vol. 3, 479 - 494, Verlag Chemie (1983)
- SODEK, L.:
Partial purification and properties of diaminopimelate decarboxylase from maize endosperm
Rev. Bras. Bot. **1**, 65 - 69 (1978)
- STARNES, W.L.; MUNK, P.; MAUL, S.B.; CUNNINGHAM, G.N.; COX, D.J.; SHIRE, W.:
Threonine-sensitive aspartokinase-homoserine dehydrogenase complex. Amino acid composition, molecular weight, and subunit composition of the complex
Biochemistry **11**, 677 - 687 (1972)
- STRAGIER, P.; DANOS, O.; PATTE, J.C.:
Regulation of the diaminopimelate decarboxylase. II. Nucleotide sequence of the **lys A** gene and its regulatory region
J. Mol. Biol. **168**, 321 - 331 (1983)

- SUNDHARADAS, G.; GILVARG, C.:
Biosynthesis of α,ϵ -diaminopimelic acid in **Bacillus megaterium**
J. Biol. Chem. **242**, 3983 - 3984 (1967)
- SZCZESIUL, M.; WAMPLER, D.E.:
Regulation of a metabolic system *in vitro*: Synthesis of threonine from aspartic acid
Biochemistry **15**, 2236 - 2244 (1976)
- TAMIR, H.; GILVARG, C.:
Dihydrodipicolinic acid reductase
J. Biol. Chem. **249**, 3034 - 3040 (1974)
- THIERRY, J.C.; MORAS, D.; EID, P.; HIRTH, C.:
Crystallization of **E. coli** aspartate β -semialdehyde dehydrogenase
Biochimie **62**, 739 - 740 (1980)
- TYAGI, V.V.S.; HENKE, R.R.; FARKAS, W.R.:
Occurrence of diaminopimelate epimerase in maize
Biochim. Biophys. Acta **719**, 363 - 369 (1982)
- TYAGI, V.V.S.; HENKE, R.R.; FARKAS, W.R.:
Partial purification and characterization of dihydrodipicolinic acid reductase from maize
Plant Physiol. **73**, 687 - 691 (1983)
- TRUFFA-BACHI, P.; VAN RAPENBUSCH, R.; GROS, C.; COHEN, G.N.:
The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of **Escherichia coli** K12. 4. Isolation, molecular weight, amino acid analysis and behaviour of the sulfhydryl groups of the protein catalysing the two activities
Eur. J. Biochem. **5**, 73 - 80 (1968)
- UMBARGER, H.E.:
Amino acid biosynthesis and its regulation
Ann. Rev. Biochem. **47**, 533 - 606 (1978)
- VOGEL, H.J.; BONNER, D.M.:
Acetylornithinase of **Escherichia coli**: Partial purification and some properties
J. Biol. Chem. **218**, 97 - 106 (1956)
- VOGEL, J.P.; HIRVONEN, A.P.:
Diaminopimelate decarboxylase (**Spirodela oligorhiza**)
Methods Enzymol. **17B**, 146 - 150 (1971)

- WADE, R.: BIRNBAUM, S.M.; WINITZ, M.; KOEGEL, R.J.; GREENSTEIN, J.P.:
Preparation and properties of the isomeric forms of α -amino- and α,ϵ -diaminopimelic acid
J. Amer. Chem. Soc. **79**, 648 - 652 (1957)
- WALLER, G.R.; NOWACKI, E.K.:
Alkaloid biology and metabolism in plants
Plenum Press (1978)
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J.:
Intracellular localization of aspartate kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves
Plant Physiol. **71**, 780 - 784 (1983)
- WALLSGROVE, R.; MAZELIS, M.:
The enzymology of lysine biosynthesis in higher plants. Complete localization of the regulatory enzyme dihydrodipicolinate synthase in the chloroplasts of spinach leaves
FEBS Lett. **116**, 189 - 192 (1980)
- WALLSGROVE, R.; MAZELIS, M.;
Spinach leave dihydrodipicolinate synthase: Partial purification and characterization
Phytochemistry **20**, 2651 - 2655 (1981)
- WALSH, C.T.:
Recent developments in suicide substrates and other active site-directed inactivating agents of specific target enzymes
Horizons Biochem. Biophys. **3**, 36 - 81 (1977)
- WALSH, C.T.:
Suicide substrates, mechanism-based enzyme inactivators: recent developments
Ann. Rev. Biochem. **53**, 493 - 535 (1984)
- WEBSTER, F.H.; LECHOWICH, R.V.:
Partial purification and characterization of dihydrodipicolinic acid synthase from sporulating *Bacillus megaterium*
J. Bacteriol. **101**, 118 - 126 (1970)
- WEINBERGER, S.; GILVARG, C.:
Bacterial distribution of the use of succinyl and acetyl blocking groups in diaminopimelic acid biosynthesis
J. Bacteriol. **101**, 323 - 324 (1970)
- WENKO, L.K.; TREICK, R.W.; WILSON, K.G.:
Isolation and characterisation of a gene encoding meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Glycine max*
Plant Molec. Biol. **4**, 197 - 204 (1985)

WHITE, P.J.:

The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by **Bacillus sphaericus**
J. Gen. Microbiol. **129**, 739 - 749 (1983)

WHITE, P.J.; KELLY, B.:

Purification and properties of diaminopimelate decarboxylase from **Escherichia coli**
Biochem. J. **96**, 75 - 84 (1965)

WINK, M.:

Wounding-induced increase of quinolizidine alkaloid accumulation in lupin leaves
Z. Naturforsch. **38c**, 905 - 909 (1983)

WISEMAN, J.S.; NICHOLS, J.S.:

Purification and properties of diaminopimelic acid epimerase from **Escherichia coli**
J. Biol. Chem. **259**, 8907 - 8914 (1984)

YAGUCHI, M.; LANK, E.; DWORNICZAK, B.; KILTZ, H.H.; PONGS, O.:

Identification of cysteine-10 of protein S 18 as part of the mRNA-binding site of **Escherichia coli** ribosomes by affinity-labeling studies with a chemically reactive A-U-G analog
Eur. J. Biochem. **92**, 243 - 251 (1978)

YAMAGUCHI, K.; ISHINO, S.; ARAKI, K.; SHIRAHATA, K.:

¹³C NMR studies of lysine fermentation with a **Corynebacterium glutamicum** mutant
Agric. Biol. Chem. **50**, 2453 - 2459 (1986)

YAMAKURA, F.; IKEDA, Y.; KIMURA, K.; SASAKAWA, T.:

Partial purification and some properties of pyruvate-aspartic semialdehyde condensing enzyme from sporulating **Bacillus subtilis**
J. Biochem. **76**, 611 - 621 (1974)

YUGARI, Y.; GILVARG, C.:

Coordinated end-product inhibition in lysine synthesis in **Escherichia coli**
Biochim. Biophys. Acta **62**, 612 - 614 (1962)

YUGARI, Y.; GILVARG, C.:

The condensation step in diaminopimelate biosynthesis
J. Biol. Chem. **240**, 4710 - 4716 (1965)

ZAKIN, M.M.; DUCHANGE, N.; FERRARA, P.; COHEN, G.N.:

Nucleotide sequence of the **met L** gene of **Escherichia coli**. Its product, the bifunctional aspartokinase II-homoserine dehydrogenase II, and the bifunctional product of the **thr A** gene, aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I, derived from a common ancestor
J. Biol. Chem. **258**, 3028 - 3031 (1983)

Ich möchte allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der RUB für das angenehme Arbeitsklima danken.

Herrn L. Andert danke ich für viele hilfreiche Tips zur Durchführung chemischer Synthesen, Herrn Dr. H.H. Kiltz für die Aminosäurenanalyse, Herrn E. Schönbrunn für seine Unterstützung bei der Reinigung der Dihydrodipicolinat Reduktase, Herrn Prof. Dr. P. Welzel und Herrn W. Bohg für die Durchführung der Ozonolyse und Herrn H. Winking für die Anfertigung der Abbildungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. E. Ebert von der CIBA-GEIGY AG, Basel, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, sowie Herrn Dr. L. Maier und Herrn Dr. H.C. Steinrücken.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. N. Amrhein für die Überlassung des Themas, für seine stets freundliche Anteilnahme und große Unterstützung sowie für die Freiheiten bei der Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

Name: Bernd Laber

Geburtsdatum: 31.10.1958

Geburtsort: Schwelm

Schulbildung: 1965 - 1968 Grundschule
1968 - 1977 Gymnasium, Abschluß mit der
Allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst: 1977 - 1978

Studium: 1978 Beginn des Studiums der Biologie an
der Ruhr-Universität Bochum.

1984 Abschluß meiner Diplomarbeit am
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie.

Seitdem Wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie,
und Anfertigung meiner Dissertation
unter Leitung von Prof. Dr. N. Amrhein.

